



UNIVERSIDADE DE LISBOA  
Faculdade de Medicina Veterinária

UTILIZAÇÃO DE LASER OU DE FIBRINA RICA EM PLAQUETAS NO MANEIO DE  
FERIDAS DO MEMBRO DISTAL EQUINO

Margarida Reynolds de Sousa Resende

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

**Presidente:**

Doutor Jorge Manuel de Jesus Correia

**Vogais:**

Doutora Paula Alexandra Botelho

Garcia de Andrade Pimenta Tilley

Dra. Constança Moreira da Fonseca

Sepúlveda

ORIENTADOR

Dra. Constança Moreira da Fonseca

Sepúlveda

CO-ORIENTADOR

Doutora Graça Maria Leitão Ferreira Dias

2019  
LISBOA

---





UNIVERSIDADE DE LISBOA  
Faculdade de Medicina Veterinária

UTILIZAÇÃO DE LASER OU DE FIBRINA RICA EM PLAQUETAS NO MANEIO DE  
FERIDAS DO MEMBRO DISTAL EQUINO

Margarida Reynolds de Sousa Resende

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

**Presidente:**

Doutor Jorge Manuel de Jesus Correia

**Vogais:**

Doutora Paula Alexandra Botelho

Garcia de Andrade Pimenta Tilley

Dra. Constança Moreira da Fonseca

Sepúlveda

ORIENTADOR

Dra. Constança Moreira da Fonseca

Sepúlveda

CO-ORIENTADOR

Doutora Graça Maria Leitão Ferreira Dias

2019  
LISBOA

---

## **Agradecimentos**

Terminada esta fase de passagem pelo MIMV, gostava de agradecer a todas as pessoas que de alguma maneira contribuíram para este processo de aprendizagem.

Antes de mais, gostaria de agradecer à minha mãe, ao meu pai, à minha irmã Leonor e aos meus avós, pelo exemplo, inspiração e conselhos transmitidos todos os dias da minha vida. Sem o seu apoio este caminho não seria possível.

O maior dos meus agradecimentos vai para a minha orientadora, Dra. Constança Moreira da Fonseca, por todo o conhecimento, apoio, dedicação, amizade e paciência transmitidos durante este ano. Devo-lhe ainda o meu crescimento como Médica Veterinária, pela aposta que fez nas minhas capacidades e por corrigir-me sempre que necessário. O estágio curricular é e será um pilar na minha vida profissional e pessoal.

Devo um enorme agradecimento à minha co-orientadora, Professora Doutora Graça Ferreira Dias, que desde o primeiro dia se mostrou totalmente disponível para apoiar e transmitir todo o seu conhecimento. Também pela sua amabilidade, perseverança, e grande apoio nos momentos mais difíceis, que fazem toda a diferença. É inspirador o seu enorme prazer e dedicação em ensinar as novas gerações de Médicos Veterinários.

Gostaria de agradecer a todos os Médicos Veterinários e clientes que tive a oportunidade de conhecer e que, graças à sua disponibilidade, permitiram que este projeto se tornasse possível. Principalmente, às médicas veterinárias Rita Costa Cabral, Carolina Guerreiro, Teresa Falcão, Ana Costa, à Associação Todos a Galope, ao Centro Hípico André Simão, à Coudelaria Quinta do Monte, à APTEC e à CRIAR-T, por me receberem da melhor forma e por todo o conhecimento que me transmitiram. Ao Professor Luís Telo da Gama, agradeço a ajuda com a análise estatística.

Às minhas estimadas colegas de curso, Francisca, Maria, Ana e Sofia, cujos apoio e companhia foram, muitas vezes, uma salvação ao longo deste percurso académico. Aos meus grandes amigos e companheiros de curso, estudo e experiências fora da faculdade, Sebastião, Madalena e Ana.

À Missão País, que durante estes anos me ajudou a crescer e a adquirir experiências e amigos insubstituíveis.

A todos os meus queridos amigos, que me acompanham em todas as etapas da minha vida.

Ao Tomás pelo seu apoio incondicional e infindável paciência.



## **Resumo**

### **UTILIZAÇÃO DE LASER OU DE FIBRINA RICA EM PLAQUETAS NO MANEIO DE FERIDAS DO MEMBRO DISTAL EQUINO**

As feridas do membro distal equino que cicatrizam por segunda intenção, são potencialmente de cicatrização lenta. O objetivo do estudo consistiu na avaliação do efeito terapêutico do laser ou da aplicação de fibrina rica em plaquetas (PRF) na cicatrização de feridas por segunda intenção de membros distais de equinos e de etiologia traumática, em comparação com o método convencional na prática clínica. Todas as feridas (n=9) possuíam diferentes dimensões iniciais e tempos desde a sua lesão até à primeira observação clínica. Consideraram-se três grupos: o grupo controlo (pomada tópica + penso); o grupo laser (terapia do laser + penso); e o grupo PRF (PRF + penso). As feridas foram fotografadas e medidas, com posterior cálculo das suas áreas diárias (retangular e elítica) e da sua taxa de cicatrização. Na análise estatística utilizou-se o teste de variância unifatorial (one-Way ANOVA) e o teste post-hoc de Duncan, com significância de  $P < 0,05$ . A taxa de cicatrização foi superior no grupo laser em relação aos grupos controlo e PRF ( $P < 0,05$ ), mas semelhante entre o grupo PRF e o grupo controlo. Em conclusão, este estudo preliminar sugere a continuação de trabalhos de estudo em feridas do membro distal do cavalo utilizando laser e PRF numa maior amostragem e em condições controladas.

**Palavras-Chave:** Cavalo; Ferida; Cicatrização; Laser; Fibrina Rica em Plaquetas

## **Abstract**

### **LASER OR PLATELET-RICH FIBRIN APPLICATION ON MANAGEMENT OF EQUINE DISTAL LIMB WOUNDS**

Equine distal limb wounds that are left to heal by second intention are potentially slow healing. This study evaluated the therapeutic effect of laser or the application of platelet-rich fibrin (PRF) in wound healing by second intention of distal limbs of horses and of traumatic etiology, in comparison with the conventional method in clinical practice. All wounds ( $n = 9$ ) had different initial dimensions and times since their injury until their first clinical observation. Three groups were considered: the control group (topical ointment + dressing); laser group (laser therapy + dressing); and the PRF group (PRF therapy + dressing). The wounds were photographed and measured, with subsequent calculation of their daily areas (rectangular and elliptical) and their healing rate. In the statistical analysis, a one-way ANOVA and a post hoc comparison test (Duncan test) were used, with significance of  $P < 0.05$ . The healing rate was higher in the laser group compared to the control and PRF groups ( $P < 0.05$ ), but similar between the PRF group and the control group. In conclusion, this preliminary study suggests the continuation of studies on wounds of the distal limb of the horse using laser and PRF therapies in a larger sampling and under controlled conditions.

**Keywords:** Horse; Wounds; Healing; Laser; Platelet Rich Fibrin

## Índices

### Índice Geral

<b>I. RELATÓRIO DE ESTÁGIO .....</b>	<b>1</b>
<b>II. OBJETIVO .....</b>	<b>2</b>
<b>III. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>3</b>
<b>IV. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>4</b>
<b>1. A Pele .....</b>	<b>4</b>
<b>2. Caracterização de feridas .....</b>	<b>5</b>
<b>3. Processo de cicatrização das feridas .....</b>	<b>6</b>
<b>4. Feridas do membro distal equino .....</b>	<b>10</b>
<b>5. Terapias regenerativas .....</b>	<b>12</b>
5.1. Laser .....	13
5.1.1. O aparelho laser .....	14
5.1.2. Mecanismo de ação .....	16
5.1.3. Parâmetros do laser .....	17
5.1.4. Terapia do laser em Medicina Veterinária .....	20
5.1.5. Terapia do laser na cicatrização de feridas .....	23
5.2. Fibrina Rica em Plaquetas (PRF) .....	24
5.2.1. História e definição .....	24
5.2.2. Componentes biológicos e mecanismo de ação .....	26
5.2.3. Variações do PRF .....	28
5.2.4. PRF em Medicina Veterinária .....	29
5.2.5. Uso de PRF na cicatrização de feridas .....	29
<b>V. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>31</b>
<b>1. Caracterização da população em estudo .....</b>	<b>31</b>
<b>2. Grupos de estudo .....</b>	<b>32</b>
2.1. Grupo Controlo .....	33
2.2. Grupo Laser .....	33
2.3. Grupo Fibrina Rica em Plaquetas .....	34
<b>3. Avaliação e medição das feridas .....</b>	<b>36</b>
<b>4. Análise estatística .....</b>	<b>38</b>
<b>VI. RESULTADOS .....</b>	<b>39</b>
<b>VII. DISCUSSÃO .....</b>	<b>432</b>
<b>VIII. CONCLUSÃO .....</b>	<b>476</b>
<b>IX. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>487</b>
<b>X. ANEXOS .....</b>	<b>587</b>



## **Índice de Figuras**

<b>Figura 1-</b> Expansão inicial das feridas.....	11
<b>Figura 2-</b> Os componentes do laser. Adaptado de Riegel e Godbold (2017).....	15
<b>Figura 3-</b> Tecido alvo da fotobiomodulação (Hochman, 2018).....	17
<b>Figura 4</b> - Apresentação esquemática das principais áreas onde o laser pode atuar (Hamblin & Demidova, 2006).....	21
<b>Figura 5</b> - Sangue posterior à centrifugação com a formação de um coágulo de fibrina estruturado no meio do tubo, entre os glóbulos vermelhos no fundo do tubo e plasma acelular no topo.....	25
<b>Figura 6</b> - Coágulo de fibrina PRF e a sua divisão em três partes distintas. Adaptado de Dohan et al., (2006b).....	26
<b>Figura 7-</b> Ferida com o envolvimento de tecidos moles na lesão.....	32
<b>Figura 8-</b> Apresentação da preparação da Fibrina Rica em Plaquetas e material utilizado.....	35
<b>Figura 9-</b> Classificação do tecido de granulação quanto à regularidade da superfície.....	36
<b>Figura 10</b> - Classificação do tecido de granulação quanto ao seu aspeto superficial.....	36
<b>Figura 11</b> - Exemplo das medições ao longo da recolha de dados do presente estudo.....	37
<b>Figura 12</b> - Fotografias digitais das medições das feridas com fita métrica ao longo da recolha de dados do presente estudo.....	37
<b>Figura 13</b> - Fórmulas dos cálculos utilizados para as áreas retangular e elítica e para a taxa global de cicatrização.....	38
<b>Figura 14</b> – Exemplos da evolução das feridas de cada grupo, ao longo do tempo.....	42

## **Índice de Tabelas**

<b>Tabela 1-</b> Classificação das feridas. Adaptado de Provost (2019).....	6
<b>Tabela 2-</b> Exemplos de situações patológicas da Medicina Veterinária onde a PBMT pode ser aplicada (Johnson, et al., 2017).....	22
<b>Tabela 3-</b> Fatores de crescimento libertados pelo PRF e as suas funções biológicas nos tecidos (Dohan et al., 2006b & Fujioka-Kobayashi et al, 2017).....	27
<b>Tabela 4</b> – Dimensão inicial de cada ferida.....	40
<b>Tabela 5</b> – Taxa global de cicatrização de cada ferida.....	41

## **Índice de Gráficos**

<b>Gráfico 1-</b> A janela terapêutica para a PBMT. Diferentes substâncias absorvem preferencialmente a luz laser em diferentes comprimentos de onda. Adaptado de Riegel e Godbold (2017).....	18
<b>Gráficos 2 e 3</b> - O gráfico da esquerda corresponde às áreas iniciais das feridas (cm <sup>2</sup> ) nos grupos controlo, laser e PRF e o gráfico da direita, está representado o tempo decorrido desde a realização das feridas até à primeira observação médico-veterinária.....	39
<b>Gráfico 4</b> – Início do processo de epitelização nos diferentes grupos de estudo.....	40
<b>Gráfico 5</b> - Taxas globais de cicatrização nos diferentes grupos de estudo.....	41

## **Listas de Abreviaturas, Acrónimos e Símbolos**

$\lambda$ -comprimento de onda

**A-PRF**- *Advanced Platelet-rich Fibrin*

**A-PRF+**- *Advanced Platelet-rich Fibrin plus*

**ATP**- *adenosine triphosphate*

**BMP<sub>2</sub>**- *Bone Morphogenetic Protein 2*

**CCE**-carcinoma de células escamosas

**EGF**-*epidermal growth factor*

**FCR**- força centrífuga relativa

**FGF**-*fibroblast growth factor*

**FGF $\beta$** - *fibroblast growth factor beta*

**g**- unidade de medida da FCR que equivale à aceleração da gravidade na superfície da Terra

**Hb**-hemoglobina

**HbO<sub>2</sub>**-oxihemoglobina

**IGF**- *insulin-like growth factor*

**IGF-1**-*insulin-like growth factor-1*

**IL-1**-interleucina 1

**IL-6**-interleucina 6

**i-PRF**- *injectable Platelet-rich Fibrin*

**K<sup>+</sup>**-ião potássio

**LED**-díodo emissor de luz

**MEC**-matriz extracelular

**MSC**-*mesenchymal stem cells*

**mW**-miliwatt

**Na<sup>+</sup>**-ião sódio

**NADH**-*nicotinamide adenine dinucleotide redox*

**nm**-nanômetros

**NGF**- *nerve growth factor*

**PDGF**-*platelet-derived growth factor*

**PRF**-*platelet-rich fibrine*

**PRP**-plasma rico em plaquetas (*platelet-rich plasma*)

**PBMT**-*photobiomodulation therapy*

**rpm**-rotações por minuto

**SNC**-Sistema Nervoso Central

**SNP**-Sistema Nervoso Periférico

**TGF $\beta$** - *Transforming growth factor beta*

**TGF- $\beta$ 1**- *Transforming growth factor beta1*

**TNF $\alpha$** -*tumor necrosis factor alpha*

**TNF $\beta$** -*tumor necrosis factor beta*

**VEGF**-*Vascular Endothelial Growth Factor*



## I. RELATÓRIO DE ESTÁGIO

O estágio curricular, do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa (FMV-UL), foi realizado entre 6 de Agosto de 2018 e 20 de Dezembro de 2018, sob orientação da Dra. Constança Moreira da Fonseca Sepúlveda e coorientação da Professora Doutora Graça Ferreira Dias. Este estágio foi realizado no âmbito da clínica ambulatória de equinos, na empresa Hcmae Lda, nas zonas da grande Lisboa e Ribatejo, incluindo dias úteis e, por vezes, fins de semana ou noites, dependendo da casuística de urgências.

Estes 5 meses permitiram-me adquirir conhecimentos teóricos e práticos em diversas áreas da Medicina Veterinária Equina, tais como medicina preventiva, medicina desportiva, diagnóstico por imagem, medicina interna, reprodução e cirurgia equina. Mais concretamente, foi possível acompanhar casos de origem respiratória, gastrointestinal, dermatológica, endócrina, neurológica, urológica, cardiológica, infecciosa, músculo-esquelética, oftalmológica e cirúrgica. A esmagadora maioria dos casos que acompanhámos ao longo do estágio integram-se no grupo das doenças do sistema locomotor/ músculo-esquelético, apesar de ter existido uma variedade considerável de casos.

Houve a oportunidade de participar em diversas atividades clínicas, como, por exemplo, a discussão dos casos clínicos, interpretação de resultados laboratoriais, realização de exames físicos, dentisterias, administração de medicamentos, vacinações e desparasitações, colheita de amostras biológicas diversas, utilização de meios de diagnóstico como ecografia e radiografia, palpações transrectais na ótica da patologia gastrointestinal ou da avaliação reprodutiva, entubações nasogástricas, colocação de cateteres centrais, bloqueios perineurais, infiltrações articulares, aplicação de pensos, utilização da terapia do laser em feridas e lesões dos tecidos moles, utilização de Fibrina Rica em Plaquetas em feridas, exames de claudicação, exames em ato de compra e pequenas intervenções cirúrgicas a campo, como suturas e castrações.

No decorrer do estágio foi possível adquirir novas competências no que diz respeito às funções de rotina de um médico veterinário ambulatório de equinos, bem como no contacto com clientes ou com outros colegas. Além disso, foi muito importante o aprender a lidar com casos de urgência graves e a melhor maneira de como atuar nessas situações.

Este estágio também permitiu a observação e assistência nas grelhas veterinárias de diversas Provas de Endurance Nacionais e Internacionais como, por exemplo, *International Endurance Festival* de Rio Frio.

Foi um estágio muito enriquecedor tanto a nível profissional como a nível pessoal.

## **II. OBJETIVO**

O presente estudo pretendeu abordar os aspetos clínicos do processo de cicatrização de feridas cutâneas localizadas nos membros distais de equino, quando tratadas com a terapia do laser aplicada em Medicina Veterinária e uma terapia regenerativa, relativamente recente, aplicada, na sua maioria, em Medicina Humana – Fibrina Rica em Plaquetas. Assim sendo, o objetivo deste trabalho consistiu na avaliação da eficácia das duas terapias alternativas (Laser ou Fibrina Rica em Plaquetas, que tem como sigla “PRF”) em feridas do membro distal do cavalo que cicatrizaram por segunda intenção, no que diz respeito à redução do tempo de cicatrização, quando comparadas com o método convencional do manejo de feridas.

### III. INTRODUÇÃO

As lesões traumáticas têm grande incidência na clínica equina, tanto em cavalos de competição como em cavalos de lazer (Owen, Singer, Clegg, Ireland, & Pinchbeck, 2012). Possivelmente, esta situação deve-se ao facto de os cavalos serem animais de grande porte com um comportamento muito ativo e de elevada força. Segundo Mellor, Love, Walker, Gettinby, e Reid (2001), na Escócia e no norte de Inglaterra, as lesões traumáticas nestes animais são as principais causas de visitas veterinárias, no que diz respeito a situações não rotineiras.

O manejo de feridas, principalmente nos membros distais de equinos, pode tornar-se um desafio, requerendo conhecimentos e cuidados excepcionais para alcançar um bom resultado. Este bom resultado consiste, não só numa cicatrização rápida, pois o cavalo tem de se encontrar fora de trabalho até ao encerramento da ferida, como numa manutenção da função dos tecidos envolvidos e, também, numa formação de tecido cicatricial estético.

Assim, existe a necessidade de procurar o tratamento ideal para superar os diversos desafios que as feridas de equinos constituem, tendo a medicina regenerativa um lugar importante neste campo (Theoret, 2017). Desde o início do século XXI, uma terapia regenerativa inovadora, da família dos concentrados plaquetários, tem sido investigada, principalmente em Medicina Humana (Dohan et al., 2006a). Esta tem o nome de fibrina rica em plaquetas (PRF) e consiste numa segunda geração do mais conhecido plasma rico em plaquetas (PRP), com características inovadoras e um método de preparação mais simples (Choukroun, Adda, Schoeffler, & Vervelle, 2001).

Também a fotobiomodulação (PBMT), mais concretamente o laser, tem vindo a ganhar popularidade no que diz respeito à regeneração de tecidos (Dahlgren, 2018). Estudos recentes mostraram que a terapia com laser de baixa potência altera a resposta inflamatória e imunológica, e promove a cicatrização em diferentes tipos de tecido (Hamblin & Demidova, 2006).

## IV. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1. A Pele

No estudo de soluções de continuidade da pele, é importante perceber como esta é constituída, pois a perda da integridade deste órgão tem graves consequências para o organismo.

A pele é um órgão muito importante para todos os seres vivos, desempenhando variadas funções como a proteção física e imunológica de agentes físicos, químicos e microbiológicos; a prevenção da perda de água; a regulação da temperatura do corpo e tato, garantindo, assim, um adequado funcionamento de todos os tecidos internos (Scott & Miller, 2011; Stashak & Theoret, 2014). É também uma boa indicadora do estado geral de saúde do animal (Scott & Miller, 2011). É constituída por duas camadas: a epiderme e a derme (Theoret, 2017). Atualmente, a grande parte dos autores não considera a camada denominada hipoderme como pele, mas sim como tecido subcutâneo que se encontra subjacente a esta, suportando-a e contribuindo para o isolamento das estruturas corporais (Scott & Miller, 2011; Stashak & Theoret, 2014; Theoret, 2017). No entanto, ainda podemos encontrar alguns autores que consideram a chamada hipoderme como sendo uma terceira camada da pele (Budras, Sack, Röck, Horowitz, & Berg, 2011).

A epiderme consiste na camada mais superficial e está dividida pelos estratos córneo, lúcido, granuloso, espinhoso e basal, consoante a maturação dos queratinócitos, que são os principais constituintes desta camada (Scott & Miller, 2011; Theoret, 2017). Outros importantes componentes são os melanócitos, que produzem melanina e participam na pigmentação da pele, as células de *Langerhans*, que ajudam no combate de agentes patogénicos através do processamento de antígenos e as células de *Merkel*, responsáveis pela sensibilidade ao toque, funcionando como mecanoreceptores (Scott & Miller, 2011; Hendrickson, 2019).

A derme é constituída por fibras, células e matriz extracelular (MEC), composta por proteoglicanos (Scott & Miller, 2011). O principal tipo de fibras existente corresponde ao colagénio tipo I, seguido pelo colagénio tipo III e pela elastina (Scott & Miller, 2011; Theoret, 2017). Entre os constituintes celulares, incluem-se os fibroblastos, presentes em maior número, juntamente com os mastócitos e os macrófagos (Theoret, 2017). A derme possui ainda um conjunto de vasos sanguíneos e linfáticos, redes nervosas e os anexos cutâneos, ou seja, folículos pilosos, glândulas sudoríparas e glândulas sebáceas (Theoret, 2017). Esta camada tem como funções fornecer resistência e elasticidade à pele, regular o crescimento, e coordenar processos celulares, entre eles, a proliferação, a maturação, a migração e a adesão, como também, modular a epiderme e a cicatrização das feridas (Scott & Miller, 2011).

Entre a epiderme e derme existe a membrana basal, uma camada espessa rica em glicoproteínas, que confere a adesão das duas camadas, através de hemidesmossomas, laminina e colagénio tipo IV (Theoret, 2017).

## **2. Caracterização de feridas**

Uma ferida é uma solução de continuidade presente em qualquer estrutura do organismo, sendo ela interna ou externa (Waldron & Zimmermen-Pope, 2003). Este estudo é referente a feridas da superfície externa, envolvendo a pele e estruturas subadjacentes. Uma correta avaliação inicial da ferida, por parte do médico veterinário é crucial para uma decisão terapêutica adequada. É através da anamnese e do exame clínico, que se deve tentar entender quando o animal realizou a ferida e como, avaliar que tipo de estruturas anatómicas do cavalo foram afetadas, o nível de contaminação, a localização, a dimensão e a integridade vascular da zona onde a ferida se encontra (Elce, 2017).

Existem variadíssimos tipos de feridas, conforme as estruturas envolvidas, a sua etiologia ou o nível de contaminação (Pope, 2009). Relativamente às estruturas envolvidas, uma ferida é considerada fechada quando atinge parcialmente a espessura da pele, como por exemplo, uma contusão ou uma ligeira abrasão, envolvendo só camadas mais superficiais da pele, ou aberta quando envolve toda a espessura da pele (Schumacher & Stashak, 2017). Consoante a sua etiologia, consideram-se feridas fechadas, as contusões, as lesões por esmagamento ou abrasões superficiais. As feridas abertas, incluem as incisões, lacerações, avulsões e as abrasões mais profundas que envolvem toda a espessura da pele ou perfurações (Tabela 1) (Waldron & Zimmermen-Pope, 2003; Schumacher & Stashak, 2017). Por fim, segundo o seu nível de contaminação, as feridas podem ser limpas, sempre que são feridas cirúrgicas criadas sob condições assépticas; limpas-contaminadas quando são cirúrgicas mas com uma contaminação mínima que é possível eliminar; contaminadas quando são sujas mas com o nível de bactérias menor que  $10^5$  e infetadas se o nível de bactérias é maior que  $10^5$  (Robson M. , 1979; Waldron & Zimmermen-Pope, 2003). Em caso de dúvida, todas as feridas abertas e traumáticas ou incisões com secreção purulenta devem ser tratadas como feridas infetadas (Provost, 2019).



Tabela 1- Classificação das feridas. Adaptado de Provost (2019)

	CLASSIFICAÇÃO	DESCRIÇÃO
<b>FECHADAS</b>	Por esmagamento	Quando uma parte do corpo é sujeita a elevadas forças entre dois objetos pesados
	Contusão	Lesão de tecidos e vasos que se encontram por baixo da pele
<b>ABERTAS</b>	Abrasão	Lesão da epiderme e parte da derme da pele por forças dilacerantes ou cortantes
	Avulsão	Perda de pele ou tecido caracterizada por arrancar parte do tecido de estruturas a que estão conectados.
	Incisão	Uma ferida criada por materiais pontiagudos, envolvendo muito pouco tecido envolvente
	Laceração	Uma ferida irregular criada pelo arrancamento de tecido. A lesão da pele e tecido subjacente pode ser variável
	Perfuração	Uma lesão penetrante da pele que resulta na danificação mínima da pele e variável dos tecidos subjacentes. É comum a contaminação por terra, bactérias ou pelos.

Numa ferida aberta, a primeira decisão deve ser relativa ao seu tipo de encerramento e baseada no animal e no seu estado, no nível de contaminação da solução de continuidade, na quantidade de tecido mole lesionado e na quantidade de tecido adjacente em boas condições disponível para o encerramento (Waldron & Zimmermen-Pope, 2003). As feridas podem cicatrizar por 1ª intenção, quando se realiza um encerramento primário, primário adiado ou secundário, ou por 2ª intenção, quando são deixadas abertas, encerrando pelos processos naturais de contração e epitelização do organismo (Anexo I) (Provost, 2019). A cicatrização ocorre com um encerramento primário, quando a ferida é preferencialmente suturada nas primeiras 6-8 horas, resultando num processo mais rápido e numa cicatriz mais estética (Elce, 2017). No entanto, a maior parte das feridas acidentais dos cavalos não permite a sutura das mesmas devido à elevada perda de tecido ou à sua elevada contaminação, sendo aconselhado deixar cicatrizar por segunda intenção (Hackett, 1983; Elce, 2017).

### 3. Processo de cicatrização das feridas

A cicatrização de feridas é um processo complexo, envolvendo diferentes fases e muitos tipos de componentes celulares e macromoléculas que desempenham um importante papel em cada uma. Para um clínico conseguir ter uma boa abordagem no tratamento de uma ferida, é importante conhecer a sua fisiopatologia, de modo a atuar da maneira mais correta e no período ideal.

No caso das feridas que cicatrizam por 1ª intenção, esta é conseguida através de processos de regeneração onde há migração e proliferação das células epiteliais, havendo pouca participação

de células inflamatórias (Theoret, 2017). Já a cicatrização por 2ª intenção é mais complexa e resulta, muitas vezes, numa cicatriz inferior a nível estético e menos resistente (Cuddy, 2017). Consiste em quatro fases (i) hemóstase/coagulação; (ii) inflamação aguda; (iii) proliferação celular e (iv) síntese de matriz/remodelação (Hosgood, 2006; Theoret, 2017). Contudo, existem outros autores que consideram apenas as últimas três fases, sendo a hemóstase parte da fase inflamatória (Provost, 2019).

Nos primeiros 5-10 min, após a realização da ferida, ocorre a primeira fase, a hemóstase, que tem como objetivo a paragem da hemorragia e a formação de um coágulo sanguíneo temporário para ajudar na migração celular, seguida da vasodilatação e fase inflamatória aguda (Silver, 1982; Bertone, 1989; Hosgood, 2006). A lesão dos vasos sanguíneos, induz a vasoconstrição periférica, que por sua vez, induz a ativação plaquetária, o início da cascata de coagulação e a formação do coágulo (Theoret, 2017). Este coágulo é composto por plaquetas ativadas, fluido, sangue e fibras de fibrina, conferindo à ferida proteção à contaminação e manutenção de uma hemóstase suficiente para o desenvolvimento dos processos celulares que irão ocorrer na cicatrização (Johnston, 1990). Com o progredir da cicatrização, o coágulo seca, formando-se uma crosta, que irá desaparecendo nas fases posteriores, surgindo depois o tecido de granulação (Theoret, 2017).

As plaquetas ativadas iniciam a cicatrização, através da libertação de mediadores inflamatórios (citocinas e fatores de crescimento), que aumentam a permeabilidade dos vasos e permitem a migração e difusão celular, necessários para a fase inflamatória (Theoret, 2005).

A fase inflamatória aguda corresponde aos dois primeiros dias (Theoret, 2017). No início deste período, há o recrutamento dos neutrófilos, que destroem bactérias e o tecido morto (Hosgood, 2006). Posteriormente, há a migração de monócitos e a sua transformação em macrófagos. Estes vão desempenhar um papel importante no desbridamento de tecido necrótico, na destruição dos neutrófilos, quando já não são necessários, e no controlo das fases seguintes da cicatrização, nomeadamente, na maturação e função dos fibroblastos (Bertone, 1989). Se o processo inflamatório é desregulado, tornando-se crónico, a cicatrização não progride corretamente (Theoret, 2017).

A seguinte fase, a proliferação ou reparação celular, consiste em três importantes processos, a angiogénese (formação de novos capilares), a fibroplasia (proliferação e migração dos fibroblastos, com formação do colagénio) e epitelização (reconstrução da epiderme) (Hosgood, 2006). Aparece com o desaparecimento da fase inflamatória aguda e tem como objetivo conferir proteção e proporcionar um meio ideal para a proliferação e migração celular (Theoret, 2005). A angiogénese consiste na formação de novos capilares a partir de outros pré-existentes, ocorrendo até ao sétimo dia de lesão (Silver, 1982; Bertone, 1989). No caso de uma ferida

cutânea, este processo ocorre em resposta à lesão e à situação de hipoxia estabelecida, onde são libertados diversos mediadores que funcionam como indutores angiogénicos, sendo os mais importantes, o  $\beta$ FGF e o VEGF, produzidos por macrófagos e células endoteliais ativados (Hosgood, 2006; Theoret, 2017). Em resposta, ocorre o aumento da permeabilidade microvascular, ativação e proliferação das células endoteliais, degradação local da membrana basal dos capilares e maturação dos vasos sanguíneos neoformados. O  $\beta$ FGF e o VEGF favorecem, principalmente, a ligação das células endoteliais à MEC e a sua migração para os capilares existentes na superfície da ferida (Liekens, De Clercq, & Neyts, 2001), tendo início no segundo dia após lesão (Theoret, 2005).

A formação de novos capilares permite a fibroplasia, através do fornecimento de  $O_2$  e nutrientes necessários ao crescimento das células (Silver, 1982; Theoret, 2017). Na formação de tecido de granulação ocorre a fibroplasia, tendo início entre o terceiro e quinto dia de ferida e sendo muito ativa a nível celular (Bertone, 1989; Theoret, 2017). Este tecido é caracterizado por ser muito vascularizado e pouco enervado, formado, maioritariamente, por novos capilares sanguíneos, macrófagos e fibroblastos, que proliferam e sintetizam componentes da matriz extracelular (Dyson, 1997). Este processo, apesar de não aumentar a resistência da ferida, permite a proliferação e migração das células epiteliais, ajudando na progressão da reparação (Theoret, 2005). Os fibroblastos são ativados por citocinas e fatores de crescimento, particularmente IL-1,  $TNF\alpha$ , IGF-1, PDGF, EGF, FGF e especialmente  $TGF\beta$ , libertados pelas células inflamatórias (Dyson, 1997; Theoret, 2005). Inicialmente, os fibroblastos proliferam; posteriormente, alteram a sua principal função para a síntese proteica, produzindo enzimas de degradação que facilitam a migração celular (Bertone, 1989). No fim desta fase o tecido de granulação é substituído por tecido fibroso, em que os fibroblastos sofrem apoptose ou diferenciam-se em miofibroblastos (Theoret, 2017).

A epitelização consiste na proliferação e na migração de células epiteliais, com o intuito de preencher a solução de continuidade com um novo epitélio (Bertone, 1989). A proliferação epitelial inicia-se na borda da ferida e desenvolve-se em direção centrípeta (Larjava, Salo, Haapasalmi, Kramer, & Heino, 1993). Em feridas cutâneas de espessura parcial, a migração epidérmica inicia-se quase imediatamente pelas margens do epitélio já existente e pelos anexos cutâneos, como folículos pilosos e glândulas sudoríparas (Hosgood, 2006). Em feridas cutâneas de espessura total, a epitelização só consegue ter início após a formação do tecido de granulação adequado (Hosgood, 2006). Geralmente, o novo epitélio não é visível nas bordas da ferida até quatro a cinco dias após a lesão, apesar de ter início nos primeiros dois dias (Theoret, 2005; Provost, 2019). A monocamada de queratinócitos recém-estabelecida adere à nova membrana basal e diferencia-se em uma epiderme estratificada, podendo levar semanas a meses, de modo

que a epitelização completa pode nunca ser alcançada, especialmente no centro onde o novo epitélio é mais fino e frágil (Theoret, 2017). A migração é determinada pela ligação de integrinas das células epidérmicas com proteínas, incluindo fibronectina e vitronectina, que estão situadas entre a MEC na margem da ferida (Larjava et al., 1993).

Por fim, na fase da remodelação ocorrem dois fenómenos: a contração e a remodelação da MEC (Theoret, 2017). Esta é a etapa mais demorada, que se inicia na segunda semana e dura meses ou anos até a pele voltar à sua constituição e resistência normal (Provost, 2019).

A contração é um processo importante para o encerramento da ferida e consiste no arrastamento centrípeto das células da derme e epiderme, a partir dos bordos da ferida (Provost, 2019). Este processo acelera a coaptação dos bordos da ferida e melhora a sua resistência, pois diminui a área de solução que vai ser preenchida por tecido neoformado, mais frágil que a pele saudável (Theoret, 2017). Resulta da combinação de forças geradas pela migração dos fibroblastos e da ação dos miofibroblastos, que formam firmes ligações entre os limites e a matriz das feridas e a sua contração aproxima os seus bordos (Bertone, 1989). Os miofibroblastos advêm da diferenciação dos fibroblastos, e a sua ação é induzida por mediadores como o TGF- $\beta$ 1 (Desmoulière, 1995) e a fibronectina (Serini et al., 1998). É um processo que envolve uma interação complexa, estimulada por células, MEC e citocinas (Singer & Clark, 1999). A contração é dividida em três fases: fase inicial, fase da contração rápida e fase da contração lenta (Theoret, 2005). Na fase inicial há uma retração dos bordos como uma preparação para a sua contração, que explica o aumento da área da superfície da ferida observada entre a primeira e segunda semanas (Theoret, 2017). A contração é menor em zonas onde a pele está sujeita a mais forças de tensão, como é o caso da parte distal dos membros dos equinos (Theoret, 2005). A remodelação consiste na transformação do conteúdo do tecido conjuntivo da ferida, existindo uma transição da MEC para a formação de uma cicatriz (Hosgood, 2006). Assim, a matriz provisória, que consistia em fibrina, fibronectina e ácido hialurónico, vai sendo substituída por uma matriz rica em colagénio, glicoproteínas e proteoglicanos, ambos libertados pelos fibroblastos (Dyson, 1997). A produção de colagénio começa lentamente no segundo, terceiro dia após o ferimento e atinge o seu pico de produção entre a primeira e terceira semana (Xue & Jackson, 2015; Theoret, 2017). Embora os fibroblastos da ferida produzam colagénio tipo I (maturo), que predomina na derme íntegra, o colagénio encontrado numa ferida aguda será maioritariamente do tipo III (imaturo), devido à sua expressão aumentada nas fases iniciais da cicatrização (Theoret, 2017). Ao longo da remodelação desta matriz, o colagénio vai sofrendo uma maturação, também induzida pelo TNF $\beta$ , dando-se a inversão do rácio entre estes dois tipos de colagénio (Xue & Jackson, 2015). O colagénio tipo I vai contribuir para um aumento gradual da resistência da ferida, atingindo o seu pico entre o sétimo e o 14º dia após lesão, e a

partir do qual há uma estabilização da sua quantidade de colagénio e, consequentemente da força de resistência da ferida (Hosgood, 2006). Nas primeiras três semanas o ganho desta força é maior, no entanto consiste em apenas 20-30% da força final da ferida (Theoret, 2017). A aparência aleatória das fibras de colagénio do tecido de granulação é alterada e a sua quantidade celular vai diminuindo, à medida que se dá a apoptose dos fibroblastos (Bertone, 1989). Os feixes de fibras de colagénio tornam-se mais organizados, dispondo-se ao longo das linhas de tensão e apresentando ligações cruzadas entre eles e entre as fibras pré-existentes (Silver, 1982). Toda esta nova conformação confere à pele neoformada maior resistência, porém nunca igual à pele saudável (Theoret, 2017). Este rearranjo pode levar meses ou até anos (Hosgood, 2006). A síntese e degradação de colagénio durante a remodelação está dependente de proteinases (MMPs e TIMPs), libertadas pelas células inflamatórias e fibroblastos, e capazes de degradar qualquer componente da MEC (Huang, Akaishi, & Ogawa, 2012). Se há uma alteração na apoptose dos fibroblastos e, consequentemente, no equilíbrio das proteinases, dá-se uma alteração patológica no colagénio (Xue & Jackson, 2015; Theoret, 2017). Esta condição reflete-se numa reparação atrasada e na formação excessiva de tecido fibrótico e da cicatriz (Theoret, 2017).

Embora já exista uma descrição detalhada do mecanismo dos componentes celulares e macromoleculares envolvidos na reparação dos tecidos, ainda é necessário adquirir um maior conhecimento relativo à regulação das suas atividades.

#### **4. Feridas do membro distal equino**

As feridas nos membros, principalmente na sua parte distal, ou seja, a partir do carpo/tarso (inclusive), são as mais comuns nos cavalos (Owen et al., 2012; Schumacher & Stashak, 2017). Estas feridas têm a predisposição para uma cicatrização mais prolongada e com mais complicações, comparativamente com feridas em outras espécies animais (Wilmink, 2017) e, também, em pôneis (Wilmink, Van Weeren, Stolk, Van Mil, & Barneveld, 1999; Maher & Kuebelbeck, 2018).

As feridas dos membros distais de equino cicatrizam raramente por primeira intenção devido à grande probabilidade das suturas se descingirem, por ser uma zona com muito pouca quantidade de pele, de grande tensão e movimento e de elevada contaminação (Wilmink, Herten, Weeren, & Barneveld, 2002).

O membro, para além de ter menor quantidade de pele, é menos vascularizado, encontra-se a uma menor temperatura e é muito provável as feridas envolverem estruturas subjacentes à pele. Também, na parte distal dos membros as articulações, os tendões e os ligamentos estão

protegidos por pouca quantidade de músculo e estão sujeitos a elevado movimento (Wilmink et al., 1999). Todos estes fatores físicos contribuem para uma cicatrização mais prolongada. Fisiologicamente, o atraso nos membros distais deve-se a quatro aspetos: maior expansão inicial dos bordos da ferida, fase preparatória (ou inflamatória) mais prolongada, mínima contração e uma epitelização mais limitada (Jacobs, Leach, Fretz, & Townsend, 1984; Wilmink et al., 1999).

A sua expansão inicial consiste no aumento na área da superfície da ferida para o dobro nas primeiras duas semanas, voltando ao seu tamanho original, geralmente, seis semanas depois (Figura 1) (Wilmink et al., 1999). A tendência para desenvolver uma inflamação mais prolongada, podendo tornar-se crónica, é devido a uma alteração no equilíbrio entre a produção e a inibição de fatores de crescimento e metaloproteinases (Knottenbelt, 1997). O influxo de leucócitos é mais rápido no corpo que nos membros, não porque a sua produção seja diferente, mas porque existem diferenças no ambiente anatómico que leva alterações na sua ativação (Wilmink & Van Weeren, 2005).

Figura 1 - Expansão inicial das feridas.



(a) Aspeto da ferida no dia 0; (b) Aspeto da ferida dia 16.

A grande diferença das feridas dos membros para as feridas do tronco é o facto de cicatrizarem mais por epitelização do que por contração (Wilmink et al., 1999). Esta disparidade deve-se à maior resistência da pele, que se encontra rigidamente fixa ao esqueleto nesta zona (Wilmink & Van Weeren, 2005), e à má orientação dos fibroblastos e miofibroblastos no tecido de granulação imaturo dos membros (Wilmink, Nederbragt, Weeren, Stolk, & Barneveld, 2001). Este processo torna-se cíclico, aumentando a inflamação e os níveis altos de TGF $\beta$ , o que vai diminuir ainda mais a contração e a maturação dos fibroblastos (Wilmink & Van Weeren, 2005). A cicatrização, maioritariamente por contração, é mais rápida (Wilmink et al., 1999) e resulta em cicatrizes mais pequenas e melhores, a nível estético (Jacobs et al., 1984;

Knottenbelt, 1997). Assim, forma-se uma maior área com um neoepitélio de qualidade inferior e cicatrizes mais pronunciadas. Já o processo de epitelização que ocorre é muito lento, atrasando todo o processo de cicatrização (Wilmink et al., 1999).

Outras complicações nestas feridas, principalmente nos cavalos, são o desenvolvimento excessivo de tecido de granulação e a formação de cicatrizes hipertróficas (Wilmink & Van Weeren, 2005). O tecido de granulação exuberante consiste em tecido saliente, relativamente ao nível da superfície da pele (Theoret, 2017). Nos cavalos, principalmente nos membros distais, este tecido forma-se mais rapidamente e permanece imaturo mais tempo. Assim, o tecido de granulação é mais irregular, com sulcos e fissuras, o que leva à inflamação crónica e à contínua proliferação de fibroblastos, processos estes que contribuem para a síntese de mais tecido de granulação (Theoret, 2017). Esta situação patológica vai impedir a atividade mitótica e migratória das células, levando a um maior atraso da epitelização e, consequentemente da cicatrização (Knottenbelt, 1997). Também pode explicar, uma maior expansão inicial da solução de continuidade, nas primeiras duas semanas (Theoret, 2017).

## **5. Terapias regenerativas**

A manipulação de feridas, principalmente em membros de cavalos, pode ser desafiante e, por vezes, complexa. Quando o médico veterinário se depara com feridas complicadas, o conhecimento das terapias existentes e a forma como atuam, será uma grande ajuda para uma melhor e mais rápida cicatrização. Deste modo, as terapias regenerativas são de grande importância, pois podem contribuir para a melhoria do processo de cicatrização (Theoret, 2009).

A medicina regenerativa baseia-se na ajuda da formação de tecidos que irão substituir e restabelecer os tecidos originais, que estão ausentes ou danificados (Dahlgren, 2018). É uma área com grande expansão na Medicina Humana e Veterinária e recorre a um elevado número de diversas terapias (Dahlgren, 2018). É muito usada como alternativa a enxertos de pele em cavalos, devido à escassez da pele dadora, ao risco de infeção e à perda frequente do enxerto (Theoret, 2017).

As terapias regenerativas existentes em Medicina Veterinária para o manejo de feridas em equinos estão divididas em três categorias baseadas no seu mecanismo de ação, que consistem em terapias baseadas nos tecidos de suporte, terapias celulares e terapias imunomoduladoras (Dahlgren, 2018).

As terapias baseadas nos tecidos de suporte podem ser acelulares e consistem na criação de uma base inicial e temporária que estimula a formação do tecido de granulação, permitindo uma melhor migração e adesão celular presentes na cicatrização dos tecidos (Dahlgren, 2018). Para o uso em cavalos encontram-se disponíveis no mercado produtos como bases em forma de pó, folha liofilizada ou disco para aplicação tópica (Acell Vet, Columbia, USA) e bases de ácido hialurónico, também, para aplicação tópica (EquitrX® wound healing spray gel, Bayer Healthcare LLC Animal Health Division, USA) (Theoret, 2017). Os concentrados plaquetários, como o Plasma Rico em Plaquetas (PRP) e a Fibrina Rica em Plaquetas (PRF), também podem ser consideradas terapias incluídas nesta categoria (Dahlgren, 2018).

As terapias celulares consistem no uso de células estaminais (*stem cells*), ou seja, células indiferenciadas com grande capacidade de se multiplicarem (Theoret, 2017). As células estaminais mesenquimais (MSC) são células encontradas em diversos tecidos do organismo e têm a capacidade de fornecer mediadores capazes de estimular e orquestrar os processos da cicatrização (Dahlgren, 2018). Também, no local da lesão diferenciam-se em tipos de células maduras, como fibroblastos, que atuam diretamente na cicatrização (Dahlgren, 2018).

A categoria das terapias imunomoduladoras consiste na utilização de elementos bioativos que ajudam a modular o processo de cicatrização (Theoret, 2017). Estes elementos bioativos referem-se ao conjunto de células e das suas citocinas e fatores de crescimento presentes na lesão, essenciais na estimulação certa da proliferação e migração das células epiteliais (Dahlgren, 2018). Dentro desta categoria estão ACell Vet, ácido hialurónico, membrana amniótica, PRP, PRF, MSC (Dahlgren, 2018) e a fotobiomodulação.

Segundo Theoret (2017), existem outro tipo de terapias com base na engenharia tecidual, no entanto, ainda não há produtos comercializados e disponíveis para Medicina Veterinária. Estas terapias têm por base o transplante de tecidos ou órgãos, gerados em laboratório e estes substitutos para a pele podem ser epidérmicos, dérmicos ou dermoepidérmicos (Theoret, 2017). Algumas terapias são multimodais, ou seja, atuam de diferentes modos no processo de cicatrização, ficando a fazer parte de diferentes categorias (Dahlgren, 2018), como é o caso do PRF.

### 5.1. Laser

A palavra LASER é um acrónimo para “*Light Amplification by the Stimulated Emission of Radiation*” (Porter, 1992) e consiste numa luz visível não-ionizante, pertencente ao espectro electromagnético com propriedades biomoduladoras (Riegel & Godbold, 2017). A terapia do laser, ou seja, o uso de dispositivos laser de baixa potência com a finalidade de melhorar a



resolução de lesões dos tecidos, tem possuído diversas nomenclaturas. Estas são “laser frio”, “terapia de luz/laser de nível baixo” (*low- level light/laser therapy* – LLLT), “terapia de luz/laser de baixa intensidade”, fototerapia e fotobioestimulação (Anders, Lanzaforme, & Arany, 2015). No entanto, desde 2014, ficou definido uma nomenclatura consensual a nível mundial: *Photobiomodulation Therapy* (PBMT) (Anders et al., 2015), ou seja, Terapia da Fotobiomodulação. Esta definição corresponde a todas as terapias que utilizam formas não ionizantes de fontes luminosas, incluindo laser, díodos emissores de luz (LEDs) e luz de largo espectro (Riegel, 2017).

O primeiro laser foi criado na década de 60, pelo físico Theodore H. Maiman, com base na Teoria da Relatividade de Einstein (Riegel, 2017). Esta teoria corresponde ao processo da emissão de radiação eletromagnética estimulada e expõe que um átomo excitado tem a capacidade de passar para o seu estado estável, emitindo fótons (“Emissão Espontânea”), e vice-versa (Hilborn, 1982). Também declara que, átomos no seu estado excitado, quando colidem com fótons do mesmo comprimento de onda, emitem mais fótons (Hilborn, 1982).

Inicialmente, o laser era utilizado para destruição de tecidos e na coagulação sanguínea em cirurgia (Hochman, 2018). Posteriormente, os estudos avançaram de forma à sua utilização como terapia, dando origem à, hoje denominada, Terapia da Fotobiomodulação (PBMT) (Riegel, 2017).

Este processo terapêutico tem vindo a mostrar resultados benéficos no alívio da dor e inflamação, na imunomodulação e na regeneração de tecidos e cicatrização de feridas (Hochman, 2018).

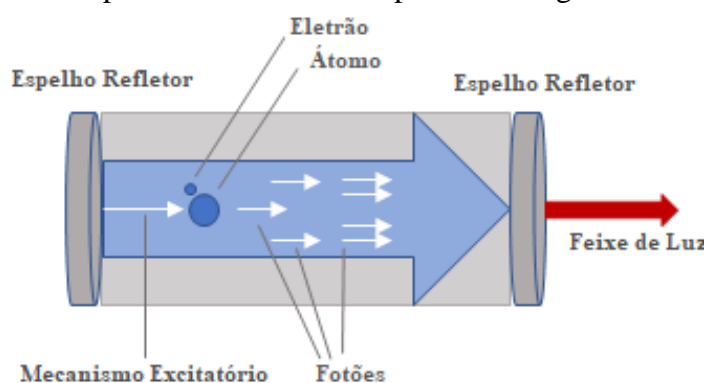
#### 5.1.1. O aparelho laser

Todos os dispositivos de laser são compostos por diferentes componentes: uma fonte energética, um meio amplificador e uma câmara de ressonância com dois espelhos (Figura 2) (Riegel & Godbold, 2017). A fonte energética incide sobre o meio amplificador onde se encontram eletrões, que vão passar ao seu estado excitado e quando estes voltam ao seu estado estável, o seu nível de menor energia, vão emitir fótons, ou seja, radiação eletromagnética (Riegel & Godbold, 2017). O meio químico do laser é específico espectralmente, o que significa que vai ditar o comprimento de onda ( $\lambda$ ) dos fótons emitidos, que também é específico, ou seja, monocromático (Coldren LA, 2012). No caso dos lasers terapêuticos, os  $\lambda$  variam entre os 620 nm e os 1200 nm, ou seja, na zona dos vermelhos e infravermelhos do espetro eletromagnético, consoante o tipo de classe do aparelho (Riegel & Godbold, 2017). Os fótons emitidos, para além de constituírem o feixe de luz emitido, vão estimular outros átomos do meio químico do laser

a emitir maior quantidade de energia, propriedade, também baseada na Teoria da Relatividade (Hilborn, 1982). O meio amplificador e a câmara de ressonância contribuem para este último fenômeno, mantendo uma estimulação contínua de emissão de fótons. Os espelhos que a revestem, devido às múltiplas passagens dos fótons por estes, permitem a colimação do feixe emitido, que é característico dos aparelhos laser (Riegel & Godbold, 2017).

As características do feixe de luz emitido pelo laser são: ser monocromático, colimado e, também, coerente (os fótons são emitidos em sincronia), o que permite a penetração nos tecidos a nível celular (Hewitt, 2001). Estas e a sua baixa potência são as grandes diferenças para outros aparelhos pertencentes às terapias fotobiomoduladoras, como, por exemplo, os LEDs (Riegel & Godbold, 2017).

Figura 2 - Os componentes do laser. Adaptado de Riegel e Godbold (2017).



Os lasers estão divididos em diferentes classes, baseadas no seu potencial de causar danos histológicos nos olhos ou pele (American National Standards Institute [ANSI], 2011). Segundo a Comissão Eletrotécnica Internacional (IEC) (2014), existem lasers de classe 1, 1M, 2, 2M, 3R, 3B e 4, sendo os primeiros de muito baixo risco e os de classe 4 de utilização mais cuidadosa (Anexo II).

A fotobiomodulação é uma terapia segura, tendo como únicas contraindicações a exposição ocular e possíveis danos nos tecidos, quando as doses utilizadas não são as recomendadas (Riegel & Godbold, 2017). Deve-se, então, como precaução, usar óculos de proteção para os olhos do técnico e, se possível, proteger os do animal (é suficiente com um tecido escuro) (Hochman, 2018). No entanto, é mais importante a proteção do profissional devido à sua proximidade do feixe e à necessária observação direta deste (Hochman, 2018). Uma das maiores preocupações com laser de alta potência é o sobreaquecimento dos tecidos, que pode ser facilmente evitado com o uso das doses recomendadas para área necessária de irradiar e, em caso de dúvida, usar o dedo do operador como um termómetro digital (Riegel & Godbold, 2017).

### 5.1.2. Mecanismo de ação

Existe um elevado número de estudos científicos que mostram os efeitos benéficos da PBMT e que esta altera a função tecidual e celular. Contudo, os efeitos benéficos são difíceis de estudar e medir e ainda não está completamente esclarecido a base da interação dos fótons com as células (Hochman, 2018).

Para a PBMT ter efeito num sistema biológico, é necessário a absorção dos fótons por um cromóforo molecular ou fotorreceptor, ou seja, uma molécula capaz de absorver luz (Anders, Ketz, & Xingjia, 2017). Quando esta é absorvida, a molécula passa para um estado excitado, alterando os seus processos moleculares primários (Passarella & Karu, 2014). Esta alteração tem efeitos biológicos a nível celular devido às reações bioquímicas secundárias e alteração da sinalização celular (Passarella & Karu, 2014).

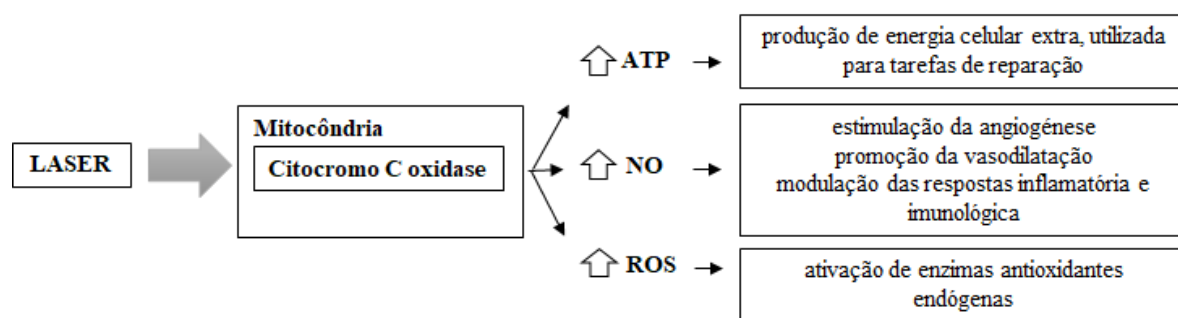
Nas membranas das mitocôndrias eucariotas encontram-se as cadeias transportadoras de eletrões, cuja função é produzir um gradiente eletroquímico de prótons transmembranares, através de reações redox e da formação do ATP (Hamblin & Demidova, 2006). Estas cadeias englobam complexos proteicos e dois deles possuem fotorreceptores: a enzima NADH desidrogenase, que absorve a luz na região espectral entre violeta e azul e a enzima citocromo C oxidase (CCO), que absorve radiação eletromagnética, dentro na região espectral dos vermelhos e infravermelhos ( $\lambda$  de 500 a 1110 nm) (Kani, 1994), ou seja, responde à luz laser. No entanto, os diferentes estados oxidativos da enzima têm espectros de absorção diferentes, explicando as desigualdades no espectro de ação do laser (Hamblin & Demidova, 2006). O seu estado excitado acelera o transporte de eletrões e, subsequentemente, aumenta o potencial da membrana mitocondrial e a síntese de ATP (Chung et al., 2012). Este processo coloca em movimento o metabolismo celular, por meio de uma cascata de reações chamada sinalização celular (Anders et al., 2017).

As cascatas de sinalização celular são ativadas pela PBMT, através do aumento de três moléculas de sinalização: a adenosina trifosfato (ATP), espécies reativas de oxigénio (ROS), pelo aumento do transporte de eletrões e o monóxido de azoto (NO), pela sua disassociação da enzima CCO (Figura 3) (Anders et al., 2017).

O aumento de ATP fornece às células uma energia adicional que pode ser usada pela célula para executar uma variedade de tarefas, incluindo a reparação de tecidos (Hochman, 2018). O ATP é a maior fonte de energia das células e, também, é uma molécula de sinalização crítica que permite que células e tecidos, em todo o organismo, comuniquem uns com os outros. Pode atuar em conjunto com fatores de crescimento, como FGF2, EGF e NGF, induzindo respostas celulares (Hamblin & Demidova, 2006). Os ROS (incluindo peróxidos, superóxido, radical

hidroxila e oxigênio singlete) são radicais livres resultantes de reações da molécula de oxigênio com os elétrons fornecidos pela fosforilação oxidativa da cadeia transportadora de elétrons (Chung et al., 2012; Prindeze et al., 2012). Em elevadas concentrações podem causar danos celulares oxidativos, mas em concentrações perto das fisiológicas têm efeitos benéficos (Hochman, 2018). A foto-ativação destes fatores, através da aceleração da cadeia transportadora de elétrons, leva à síntese de proteínas que desempenham funções na proliferação celular, na oxigenação tecidual, no aumento do fluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  e na modulação de citocinas, fatores de crescimento e outros mediadores inflamatórios (Chung et al., 2012; Hamblin e Demidova, 2006). O NO, quando ligado à enzima citocromo C oxidase, inibe a respiração mitocondrial, mas em condições hipóxicas, liberta-se desta e, na sua forma livre, atua como uma molécula de sinalização secundária responsável pela vasodilatação e crescimento vascular e pela regulação de citocinas e fatores de crescimento (Prindeze et al., 2012). A aplicação de luz laser leva à sua foto-dissociação, fazendo com que a respiração celular seja retomada, ou seja, aumenta os níveis de  $\text{O}_2$  na célula (Prindeze et al., 2012) e, o NO encontrando-se livre nos tecidos, irá mediar a vasodilatação, promover a angiogénese e modular as respostas inflamatória e imunitária (Bogdan, 2001; Hochman, 2018). Embora o complexo CCO/NO possa produzir NO em condições normóxicas, é mais ativo em concentrações reduzidas de oxigênio, logo tem maior importância sob as condições hipóxicas que acompanham muitas doenças e estados fisiopatológicos (Prindeze et al., 2012).

Figura 3- Tecido alvo da fotobiomodulação (Hochman, 2018).



### 5.1.3. Parâmetros do laser

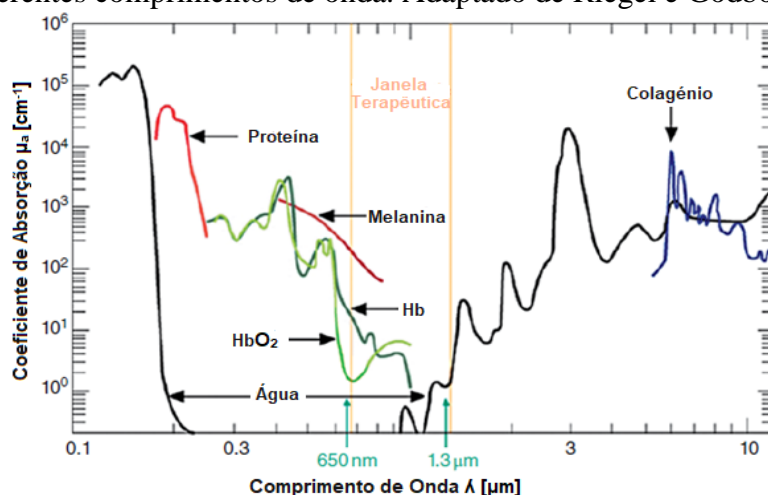
A aplicação clínica da PBMT é muito diversa, sendo aplicada em muitas áreas diferentes da Medicina Humana e Veterinária. Não existe um protocolo padrão universal na sua utilização, logo os seus parâmetros podem variar bastante (comprimento de onda, potência radiante, modo de emissão do feixe, entre outros), levando a efeitos diferentes na estimulação do laser (Hamblin & Demidova, 2006). Este é um problema, tanto a nível do seu estudo científico, como a nível

terapêutico, pois a escolha dos parâmetros ideais é essencial para a eficácia da terapia (Jenkins & Carroll, 2011; Riegel & Godbold, 2017). Muitas vezes, a seleção errada destes parâmetros não permite um resultado terapêutico eficaz, ou seja, a energia fotônica que atinge as células-alvo é insuficiente, devido a um bloqueio na transmissão dos fótons ou a uma dosagem inadequada (Riegel & Godbold, 2017). Também, a apresentação de estudos com os parâmetros errados ou mesmo omitidos, torna o seu conhecimento e prática ainda mais difícil, tratando-se de um tema que já por si é complexo (Jenkins & Carroll, 2011).

Os mais importantes parâmetros do laser, necessários ter em consideração, são a energia, dose, potência, intensidade, comprimento de onda, frequência do pulso, tamanho do ponto e ciclo de trabalho (Anexo III).

À medida que os fótons penetram nos tecidos, podem ser refletidos, dispersos e absorvidos pelas diferentes densidades dos tecidos e cromóforos acidentais que encontram (Pryor & Millis, 2015). Estes obstáculos levam a intensidades de luz exponencialmente decrescentes com a profundidade e são dependentes do comprimento de onda da luz emitida (Riegel & Godbold, 2017). Este fenómeno ocorre, por exemplo, quando a luz laser entra em contacto com a pele e com os pelos do animal e uma quantidade significativa da energia fotônica perde-se nestes, sem chegar às suas células-alvo, pelo que é aconselhada a tricotomia da área de tratamento (Riegel & Godbold, 2017). A cor da pele também influencia a penetração da energia na pele porque a melanina, sendo um cromóforo acidental, tem uma absorção muito elevada da luz laser, logo a pele escura absorve mais luz, especialmente para comprimentos de onda inferiores a 830 nm (Riegel & Godbold, 2017). Num modelo ex-vivo de pele e tendões flexores de equino, a penetração do laser foi maior para pelagens claras e mais baixa para pelagens escuras (Duesterdieck-Zellmer, Larson, Plant, Sundholm-Teppe, & Payton, 2016).

Gráfico 1 - Janela terapêutica da PBMT. Diferentes substâncias absorvem preferencialmente a luz laser em diferentes comprimentos de onda. Adaptado de Riegel e Godbold (2017).



A eficácia do tratamento varia muito consoante a dose total fornecida e o comprimento de onda, apesar de os outros parâmetros também sejam importantes (Jenkins & Carroll, 2011; Chung et al., 2012). O comprimento de onda afeta significativamente a transmissão do laser. A “janela terapêutica” para o laser é entre 800-1000nm de  $\lambda$ , onde os cromóforos das células-alvo mais profundas, conseguem absorver a luz (Gráfico 1) (Riegel & Godbold, 2017). No geral, com o aumento do  $\lambda$ , aumenta a profundidade da sua penetração do feixe nos tecidos (Riegel & Godbold, 2017). No entanto, cada  $\lambda$  tem propriedades únicas e cada um será absorvido de modo diferente pelas células que atinge, penetrando em cromóforos celulares distintos (Pryor & Millis, 2015). Assim, para a escolha dos comprimentos de onda, é necessário ter em consideração o seu poder de penetração, mas, também, a sua absorção nos diferentes tipos de células.

Os principais cromóforos que absorvem acidentalmente a luz e impedem a penetração da luz nos tecidos-alvo são a melanina, a hemoglobina e a água (Pryor & Millis, 2015). Comprimentos de onda mais curtos, no espectro vermelho visível (600–800nm) apenas permitem uma penetração mais superficial, pois uma quantidade significativa da sua energia fotónica é absorvida acidentalmente pelos cromóforos da melanina, hemoglobina e oxihemoglobina, existentes na pele (Riegel & Godbold, 2017). Em  $\lambda$  entre 1100nm e 1200nm, a água torna-se no principal absorvente acidental e a penetração torna-se mais difícil (Riegel & Godbold, 2017). Comprimentos de onda intermédios, como 810nm, são os mais importantes porque são maioritariamente absorvidos pelo citocromo C oxidase. Os aparelhos de laser têm  $\lambda$  específicos, dependentes do seu objetivo terapêutico, e cada aparelho pode possuir mais do que um. Por exemplo, existem lasers com  $\lambda$  de 650nm, 810nm e 980nm, que permitem (i) o tratamento de lesões em zonas superficiais, como a pele, pela elevada absorção do lípidos da membrana celular; (ii) a produção de ATP para uma otimização do trabalho celular, pela elevada absorção do citocromo C oxidase presente nas mitocôndrias celulares e (iii) o efeito anti-inflamatório e controlo da dor pela elevada absorção da água e do sangue, aumentando o seu fluxo.

A dose é quantificada em Joules por área ( $\text{J}/\text{cm}^2$ ) e é obtida através da energia total aplicada e a área da superfície de aplicação do laser (Prindeze et al., 2012). A aplicação dessa energia ao longo do tempo produz a potência (W) e a intensidade ( $\text{W}/\text{cm}^2$ ) (Prindeze et al., 2012). O clínico pode calcular a dose para cada paciente consoante a dose recomendada para a espécie de animal e zona do corpo e a área da superfície do tratamento (Hochman, 2018). Uma dose fora dos limites, pode ser fraca demais para ter algum efeito, ou forte demais, causando danos prejudiciais (Chung et al., 2012). No entanto, para além da dose total é importante ter em conta a intensidade e o tempo, pois aumentando o primeiro e diminuindo o segundo, ou vice-versa,

pode-se produzir efeitos muito diferentes, apesar de manter a dose constante (Jenkins & Carroll, 2011).

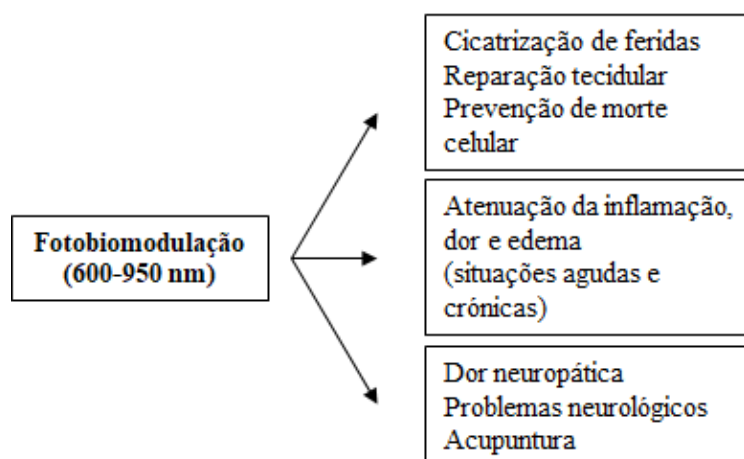
Segundo Riegel e Godbold (2017), as doses recomendadas para equinos com condições nos tecidos mais superficiais, como, por exemplo, a pele, são 1-5 J/cm<sup>2</sup>, com condições musculoesqueléticas superficiais são 8–20 J/cm<sup>2</sup> e para condições musculoesqueléticas de maior profundidade são 15–35 J/cm<sup>2</sup>. No entanto, está descrito na bibliografia variadas doses recomendadas para a terapia do laser, logo, para uma aplicação eficaz desta terapia, recomenda-se que os pacientes sejam tratados com doses relatadas como bem-sucedidas em publicações científicas e ensaios clínicos anteriormente realizados (Hochman, 2018).

Os lasers terapêuticos têm dois modos de emissão: o contínuo (“continuous wave” [CW]) que consiste na produção de um feixe com uma potência constante durante o período de emissão, logo, a potência média é igual à potência (Smith, 2017); e o pulsátil, utilizado quando há interrupções na saída de energia, emitindo o feixe com uma determinada frequência e a sua potência é 50% da potência média (Smith, 2017). A frequência da luz do laser é o número de pulsos emitidos por laser a cada segundo e a sua unidade de medida é o Hertz (Hz) (Riegel & Godbold, 2017). No entanto, não há um consenso sobre os efeitos das diferentes frequências e parâmetros de pulso na resposta fisiológica e terapêutica do laser. A coerência do feixe de luz, influenciada pelo meio do laser, também pode influenciar os seus efeitos biológicos (Hochman, 2018).

#### 5.1.4. Terapia do laser em Medicina Veterinária

Existem três áreas principais da Medicina Veterinária, onde a PBMT pode ter um papel importante: (i) cicatrização de feridas, reparação de tecidos e prevenção da morte de tecidos; (ii) alívio da inflamação, dor e edema associados; (iii) alívio da dor neurogênica e em alguns problemas neurológicos (Figura 4) (Hamblin & Demidova, 2006; Hochman, 2018).

Figura 4 - Apresentação esquemática das principais áreas onde o laser pode atuar (Hamblin & Demidova, 2006).



A PBMT tem sido muito utilizada na recuperação de lesões, pela modulação do seu processo inflamatório (Anders et al., 2017). Como já descrito, os ROS e o NO, estimulados pelo laser, modulam mediadores inflamatórios, como citocinas, fatores de crescimento ou outras proteínas. Mais concretamente, está descrito a diminuição de marcadores pró-inflamatórios como TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL6 ((Albertini et al., 2008; Anders et al., 2017). A diminuição destes fatores irá contribuir para a diminuição da estimulação da inflamação, através da diminuição da ativação de neutrófilos e macrófagos (Anders et al., 2017). Também o NO livre, estimula a vasodilatação e a angiogénese, ajudando a acelerar um processo inflamatório (Hochman, 2018). O ATP adicional estimulado pelo laser contribui para o aumento da atividade das células inflamatórias, como leucócitos, tornando o processo inflamatório mais eficaz e mais rápido (Anders et al., 2017). Assim, todos estes fatores contribuem para a atenuação da inflamação, da dor e do edema numa situação inflamatória.

A PBMT pode atuar a vários níveis no alívio da dor aguda ou crónica, tanto a nível da receção através do SNP, como da sua transmissão ao SNC (Anders et al., 2017). Para além da diminuição da inflamação, o laser também poderá atuar a nível do bloqueio da despolarização das fibras C, do aumento do potencial de ação das células nervosas, da produção das beta-endorfinas para atenuar o sinal de dor e do aumento da acetilcolina e da serotonina (neurotransmissores inibitórios) (Pryor & Millis, 2015; Anders et al., 2017; Hochman, 2018). A nível de problemas neurológicos, existem dados que sugerem que a PBMT pode ser eficaz na diminuição do comportamento da dor neuropática e na alteração do processo inflamatório associado à lesão dos nervos periféricos (Hsieh et al., 2012), como também, que o laser poderá promover a reparação e a regeneração do tecido nervoso (Hochman, 2018). Assim, poderá ajudar em doenças com degenerescência ou danos dos nervos, com atrofia musculares



desnervadas, com lesões medulares e em acidentes vasculares cerebrais (Chung et al., 2012; Hochman, 2018).

Relativamente ao seu poder de reparação e regeneração dos tecidos e ao seu papel na cicatrização de feridas, irá ser descrito em maior detalhe no capítulo seguinte.

A terapia do laser, devido à sua variedade de efeitos biológicos e benéficos a nível do organismo, pode ser usada como terapia numa vasta quantidade de condições patológicas, pertencentes a diversas áreas da Medicina Veterinária (Tabela 2).

Existem registos do uso da PBMT no manejo da dor e inflamação cirúrgica (Draper, Schubert, Clemmons, & Miles, 2012), em dores agudas graves (Bjordal, Johnson, Iversen, Aimbire, & Lopes-Martins, 2006), no manejo de feridas de qualquer etiologia, cirúrgica ou acidental (Peplow, Chung, & Baxter, 2010; Gagnon et al., 2016), e no manejo de doenças neurológicas (Anders et al., 2014; Frank & Roynard, 2018). Existe uma grande utilização desta terapia em alterações musculoesqueléticas, como osteoartrites, lesões de tendões e ligamentos, lesões musculares e fraturas (Duesterdieck-Zellmer et al., 2016). Consequentemente, é muito aplicada em medicina desportiva e reabilitação de cães e cavalos (Gross, 2014; Kaneps, 2016; Schlachter & Lewis, 2016).

Tabela 2 - Exemplos de situações patológicas da Medicina Veterinária onde a PBMT pode ser aplicada (Johnson, et al., 2017).

Aplicação de Laser em Medicina Veterinária
Cicatrização de feridas abertas
Cicatrização pós-cirúrgica
Alívio da dor pós-cirúrgica
Osteoartrite
Lesões musculares, de tendões ou ligamentos
Gengivite e problemas dentários
Otites
Dermatites e celulites
Doenças Neurológicas
Reabilitação em animais de desporto

### 5.1.5. Terapia do laser na cicatrização de feridas

A grande maioria dos estudos da PBMT tem-se concentrado na cicatrização de feridas, fornecendo informações sobre seus efeitos benéficos nas diferentes fases da cicatrização por 2ª intenção: inflamação, proliferação e remodelação celular (Thomas, O'Neill, Harding, & Shepherd, 1995; Kuffler, 2015; Bradley, 2017).

Relativamente à fase da inflamação aguda, o laser pode interferir (i) na diminuição de fatores pró-inflamatórios; (ii) no aumento da eficácia da atividade de neutrófilos, macrófagos e linfócitos, através do aumento de ATP adicional destas células; (iii) no aumento da angiogénese e vasodilatação, através do aumento do NO livre e de fatores de crescimento como FGF e VEGF (Byrnes et al., 2004; Meirelles, Santos, Chagas, Moura, & Pinheiro, 2008); (iv) na atenuação do edema e dor, através da diminuição dos fatores pró-inflamatórios e bloqueio das fibras nervosas.

A fase de proliferação consiste em três diversos processos que têm como objetivo a restauração celular do tecido lesado e que consistem na epitelização, angiogénese e fibroplasia. O laser pode contribuir para a restauração da função biológica de células lesadas, por meio da aceleração do seu metabolismo celular, aumentando a multiplicação e crescimento celular (Bradley, 2017). O laser induz efeitos primários e secundários, quando os fótons emitidos alcançam as mitocôndrias e membranas das células, tais como fibroblastos, queratinócitos e células endoteliais (Bradley, 2017). Os efeitos primários são o aumento do seu ATP adicional, utilizado para aumentar a sua atividade na reparação tecidular, e o aumento local de mediadores de resposta biológica (Chung et al., 2012; Hochman, 2018). Os efeitos secundários são a resposta do organismo aos efeitos primários que o laser induz (Karu, 1999). Estes podem consistir em (i) alterações dos níveis de cálcio intracelular, que contribuem para a modulação do metabolismo celular e a regulação das vias de sinalização responsáveis pelos eventos requeridos para reparação de feridas, tais como migração celular, síntese de DNA e RNA, mitose celular, secreção proteica e proliferação celular (Bradley, 2017); (ii) aumento da disponibilidade de O<sub>2</sub> e nutrientes, necessários para a atividade de todas as células presentes nos processos de reparação celular; (iii) efeitos metabólicos que resultam em diversas alterações fisiológicas a nível celular, como a ativação de fibroblastos, libertação de fatores de crescimento, síntese de colagénio e aumento da permeabilidade da membrana celular e da função da bomba Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>; (Bradley, 2017). Muitos estudos mostram uma mais rápida epitelização nas feridas tratadas, através da estimulação do crescimento, proliferação e diferenciação das células epiteliais (Gál et al., 2006; Iordanou et al., 2008; Meirelles et al., 2008). Segundo Prindeze et al. (2012), a angiogénese também é estimulada pela PBMT através do aumento do NO livre e de fatores de

crescimento, como o VEGF, permitindo uma neovascularização mais rápida. Outros estudos mostram que a terapia do laser leva ao aumento da proliferação dos fibroblastos (Anders, Ketz, & Xingjia, 2017) e a uma maior deposição de colagénio e melhor alinhamento e organização das suas fibras, o que fornece à ferida uma maior força de tensão (Pessoa et al., 2004; Meirelles et al., 2008). Estas últimas condições ajudam na formação de um tecido de granulação mais saudável (Meirelles et al., 2008) e na contração dos limites da ferida, através da ação dos fibroblastos e miofibroblastos (Weiss, 1992; Byrnes et al., 2004; Noudeh et al., 2010).

Uma melhor organização do colagénio e o aumento da força de tensão fornecidas pela PBMT contribui para uma fase de remodelação e uma cicatriz melhorada (Gál et al., 2006; Bayat et al., 2009; Vasilenko et al., 2009; Oliveira et al., 2010).

No entanto, ainda há falta de estudos clínicos fidedignos que provam ou refutam a eficácia do laser na cicatrização de feridas. A escassez de ensaios clínicos bem desenhados e com toda a informação necessária dificulta a avaliação do seu impacto (Chung et al., 2012). Além dos parâmetros que devem ser bem ajustados, a eficácia do tratamento também depende de muitos fatores correspondentes à localização e natureza da ferida, e o estado fisiológico do paciente (Chung et al., 2012).

Existem poucos artigos científicos que descrevem o uso da terapia do laser em feridas em cavalos (Fretz & Li, 1992; Dahlgren, 2018). Fretz et al. (1992) mostra que o uso desta terapia não tem impacto na cicatrização de feridas, no entanto ainda não existia informação suficiente sobre os parâmetros e condições ideais para o correto uso desta terapia e, desde então, o aparelho laser já sofreu alterações para um melhor uso terapêutico.

## 5.2. Fibrina Rica em Plaquetas (PRF)

### 5.2.1. História e definição

A Fibrina Rica em Plaquetas (PRF) foi desenvolvida como uma variação do Plasma Rico em Plaquetas (PRP) (Choukroun et al., 2001), ambos concentrados plaquetários muito utilizados na regeneração de tecidos, que libertam fatores de crescimento sanguíneos naturais, quando aplicados numa lesão (Choukroun & Miron, 2017). Acredita-se que este processo possa promover a cicatrização das lesões com doses superiores às fisiológicas dos fatores de crescimento obtidos pela ação das plaquetas (Dohan et al., 2006a). Apesar do seu sucesso, o PRP tem algumas limitações como o tempo prolongado de preparação do concentrado sanguíneo, a necessidade da utilização de anticoagulantes, os quais são inibidores da cicatrização e o facto de ser líquido, o que leva a uma rápida libertação dos fatores de

crescimento (Dohan et al., 2006a; De Pascale et al., 2015; Dietrich et al., 2015; Fujioka-Kobayashi & Miron, 2017). Assim, a partir do início do século, nasce a segunda geração de concentrados plaquetários de que faz parte a Fibrina Rica em Plaquetas (PRF) e as suas variações (Choukroun et al, 2001). A técnica do PRF foi desenvolvida pela primeira vez em França por Choukroun et al. (2001) para o seu uso específico em cirurgia oral e maxilofacial. Esta técnica não é nada mais do que sangue centrifugado e sem qualquer adição, nem de anticoagulante nem de trombina bovina (Dohan et al., 2006a). O protocolo para a preparação do PRF consiste na colheita de sangue autólogo (do paciente a ser tratado) em tubos de vidro, sem anticoagulante, e a sua centrifugação imediatamente após a colheita, para a formação de um coágulo de fibrina, que inclui plaquetas e leucócitos (L-PRF) (De Pascale et al., 2015). Este processo ativa a cascata de coagulação e leva à formação tridimensional de coágulo de fibrina, através da transformação do fibrinogénio pela trombina circulatória (Dohan et al., 2006a). Terminada a centrifugação, forma-se em cada tubo três diferentes camadas: (i) um concentrado de glóbulos vermelhos, (ii) um coágulo de fibrina (PRF) e (iii) um plasma acelular (Figura 5) (Choukroun & Ghanaati, 2017). As plaquetas acumulam-se na parte inferior do coágulo de fibrina, principalmente na junção entre os glóbulos vermelhos e o próprio coágulo e tem o nome de *buffy coat* (Figura 6) (Dohan et al., 2006b). O sucesso desta técnica depende inteiramente da rapidez entre a colheita de sangue e o início da centrifugação (Dohan et al., 2006a). Isto deve-se ao facto de as amostras de sangue, que sem anticoagulante, iniciam o seu processo de coagulação quase imediatamente após o contato com o tubo de colheita, o que leva à formação da fibrina de maneira difusa no tubo e obtenção de um pequeno coágulo sanguíneo sem consistência (Dohan et al., 2006a). O início rápido da centrifugação permite a concentração das moléculas de fibrinogénio na parte média e superior do tubo, antes da sua ativação.

Figura 5 - Sangue posterior à centrifugação com formação de um coágulo de fibrina localizado no meio do tubo, entre os glóbulos vermelhos no fundo do tubo e plasma acelular no topo.

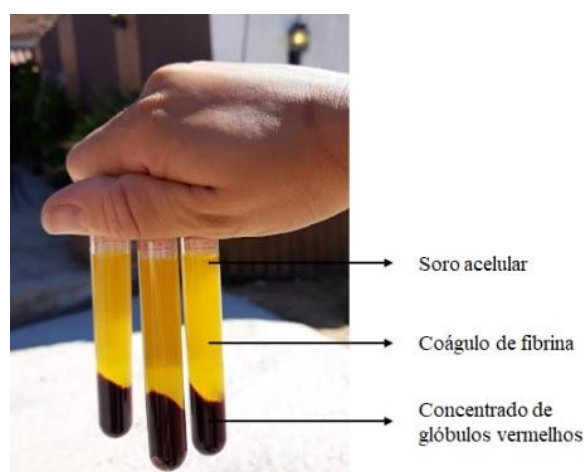
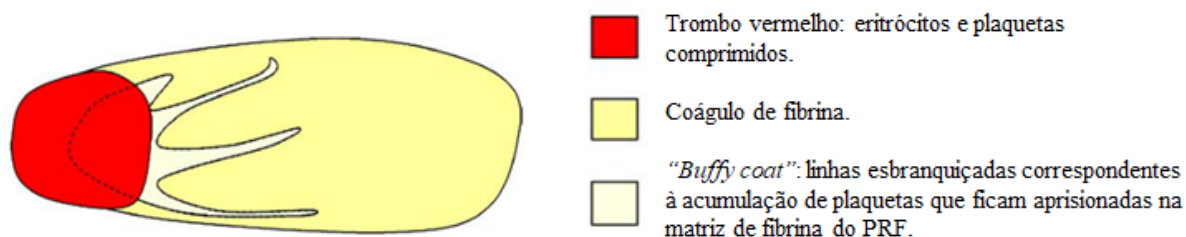


Figura 6 - Coágulo de fibrina PRF e a sua divisão em três partes distintas. Adaptado de Dohan et al., (2006b).



O estabelecimento de uma rede de fibrina flexível capaz de suportar a libertação de citocinas e a migração celular, consiste numa arquitetura fisiológica muito favorável ao processo de cicatrização (De Pascale et al., 2015). Também, a sua combinação entre células e fatores de crescimento embutidos na matriz de fibrina tridimensional, funciona de forma favorável, levando a um aumento na regeneração tecidual (Fujioka-Kobayashi & Miron, 2017).

Assim, o PRF autólogo foi introduzido e utilizado como um biomaterial extremamente fisiológico e seguro para a cicatrização de feridas no organismo, uma vez que é derivado de sangue humano ou animal, totalmente natural (Fujioka-Kobayashi & Miron, 2017).

#### 5.2.2. Componentes biológicos e mecanismo de ação

Os principais componentes do PRF são (i) células (plaquetas, leucócitos e glóbulos vermelhos), (ii) uma matriz provisória de fibrina autóloga (incluindo fibronectina e vitronectina) e (iii) uma grande variedade de moléculas bioativas que consistem em fatores de crescimento, nomeadamente os PDGF, TGF $\beta$ , VEGF, IGF, EGF e BMP<sub>2</sub> (Dohan et al., 2006b).

O PRF, tal como o PRP, contém uma grande quantidade de plaquetas na sua constituição, no entanto as alterações no protocolo do PRF, tais como a velocidade e o tempo de centrifugação, aparentam aumentar o número de macrófagos e leucócitos neste concentrado plaquetário (Fujioka-Kobayashi & Miron, 2017). Assim, o PRF contém uma variedade de células que consiste em plaquetas, leucócitos incluindo neutrófilos e macrófagos, que após a centrifugação, ficam presas entre a matriz de fibrina (Choukroun & Miron, 2017). Os macrófagos e os neutrófilos poderão contribuir para a redução das fases iniciais da cicatrização e para a destruição de microrganismos e de tecido necrótico existente nas lesões, sendo a sua presença uma das principais diferenças entre estes dois concentrados plaquetários (Choukroun & Miron, 2017).

Outra diferença entre PRF e PRP, é a ausência de anticoagulantes nos tubos de colheita de sangue, que permite a formação de uma matriz consistente provisória de fibrina (Choukroun & Miron, 2017). A matriz PRF contém glicosaminoglicanos (heparina, ácido hialurónico) a partir

do sangue e das plaquetas (Dohan et al., 2006b). Ao longo dos anos, descobriu-se que para além da fibrina atuar como suporte para o influxo de vários tipos de células como monócitos, fibroblastos e células endoteliais, também permite uma libertação lenta e gradual dos fatores de crescimento ao longo do tempo (Dohan et al., 2006b).

A terceira principal vantagem do PRF é a presença de citocinas naturais do sangue, como os fatores de crescimento já descritos (Choukroun & Miron, 2017). Durante a ativação das plaquetas pela centrifugação dá-se a libertação dos fatores de crescimento que mantêm-se na matriz de fibrina e posteriormente vão-se libertando de forma lenta e contínua (Dohan et al., 2006b). Os fatores de crescimento são muito importantes na migração, adesão, proliferação e diferenciação celular. Embora existam fatores de crescimento em todos os tecidos, o sangue serve como o principal reservatório de numerosos fatores de crescimento que promovem a regeneração tecidual (Fujioka-Kobayashi & Miron, 2017). As plaquetas e os macrófagos também libertam fatores, tais como o fator de crescimento transformador beta-1 (TGF- $\beta$ 1), o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), o fator de crescimento epidérmico (EGF) e o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) (Tabela 3) (Fujioka-Kobayashi et al., 2017). Estes fatores atuam diretamente na promoção da proliferação e diferenciação de osteoblastos, células endoteliais, condrócitos e fibroblastos (Dohan et al., 2009).

Tabela 3- Fatores de crescimento libertados pelo PRF e as suas funções biológicas nos tecidos (Dohan et al., 2006b & Fujioka-Kobayashi et al, 2017).

Fatores de Crescimento	Funções
fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF)	Regulação (estimulação ou inibição) essencial para a migração, proliferação e sobrevivência de células mesenquimais.
fator de crescimento transformador beta-1 (TGF- $\beta$ 1)	Proliferação de vários tipos de células e indução da síntese massiva de moléculas da matriz, como colagénio I e fibronectina, seja por fibroblastos ou por osteoblastos. Mediador inflamatório e agente de fibrose
fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)	Responsável pela angiogénese e o futuro fluxo sanguíneo para os tecidos danificados
fator de crescimento epidérmico (EGF)	Reguladores da proliferação e diferenciação de muitos tipos de células
fator de crescimento semelhante à insulina (IGF)	Reguladores da proliferação e diferenciação de muitos tipos de células e do processo de apoptose

Em resumo, o PRF tem todas as condições ideais para a regeneração tecidual, incluindo uma matriz de fibrina tridimensional base, células autólogas com papéis importantes na inflamação e regeneração dos tecidos e um reservatório de fatores de crescimento naturais que podem ser libertados durante um período de 10 a 14 dias (Fujioka-Kobayashi & Miron, 2017).

### 5.2.3. Variações do PRF

A diminuição das forças de centrifugação utilizando o “conceito de centrifugação de baixa velocidade” (LSCC) ou a diminuição do tempo de centrifugação levaram ao desenvolvimento de novos protocolos de preparações de PRF (A-PRF, A-PRF+ e i-PRF), que podem fornecer um aumento de plaquetas e neutrófilos dentro do coágulo e prolongar a liberação de certos fatores de crescimento (Ghanaati et al., 2014).

O protocolo segundo Choukroun et al. (2001) consiste na centrifugação do sangue a 708 g durante 10 min. A esta força g, a rede de fibrina apresenta uma estrutura densa e com pouco espaço entre as fibras (Ghanaati et al., 2014). A rede de fibrina inclui, além das plaquetas, diferentes células inflamatórias, como os leucócitos e suas subfamílias, macrófagos e células estaminais, que se dispõe entre a fibrina (Choukroun & Ghanaati, 2017). Também, a distribuição celular é maioritariamente acumulada na parte proximal ao *buffy coat*, enquanto a densidade das plaquetas diminui em direção à parte distal do coágulo (Joseph Choukroun & Ghanaati, 2017).

A modificação do protocolo de preparação pela redução da FCR para 208 g resulta no PRF Avançado (A-PRF), que apresenta uma estrutura mais porosa e com maior espaço para as células, especialmente para as plaquetas (Ghanaati et al., 2014). Esta redução da FCR leva a uma distribuição celular mais uniforme e a um número aumentado de células inflamatórias e plaquetas (Choukroun & Ghanaati, 2017).

Outra variação de protocolo pode ser o tempo de centrifugação, dando origem ao PRF Avançado plus (A-PRF +). Um pequeno decréscimo no tempo de centrifugação com a manutenção da FCR nos 208 g e da estrutura porosa e estável do A-PRF, melhora a liberação dos fatores de crescimento (Choukroun & Ghanaati, 2017). Esta melhoria da liberação dos fatores de crescimento com a diminuição do tempo de centrifugação poderá estar relacionada com a afinidade de ligação entre os vários fatores de crescimento com a fibrina e o fibrinogénio e ao impacto nas células ativadas no coágulo A-PRF + (Choukroun & Ghanaati, 2017). Segundo El Bagdadi et al., (2016), que realizou um estudo comparativo in vitro ao longo de 10 dias, o A-PRF + tem um maior potencial de libertar fatores de crescimento acumulados, especialmente o VEGF, comparado com o PRF e o A-PRF. Também um estudo de Choukroun e Ghanaati (2018) mostra o aumento de leucócitos, plaquetas, VEGF e TGF- $\beta$ 1 com a diminuição da força de centrifugação (A-PRF) e posteriormente com a diminuição do seu tempo (A-PRF+).

Segundo Choukroun e Ghanaati (2017), devido à necessidade em contextos clínicos da, também, utilização do PRF em forma injetável, criou-se o i-PRF com uma redução da FCR para 60g e o uso de tubos de plástico que permite a formação de uma matriz de PRF fluída e injetável

e sem necessidade do uso de anticoagulantes. A superfície dos tubos de plástico não permite a ativação da cascata de coagulação durante a centrifugação, mantendo o PRF fluido até 15 min após o fim da centrifugação, e permitindo a sua injeção (Choukroun & Ghanaati, 2017). Estas observações mostram que com o uso da LSCC, o PRF original pode ser melhorado relativamente à quantidade de células, libertação de fatores de crescimento e forma de aplicação (injetável ou tópica), podendo aumentar o seu potencial regenerativo (Choukroun & Ghanaati, 2017).

#### 5.2.4. PRF em Medicina Veterinária

O uso de PRF tem vindo a ganhar popularidade desde que foi introduzido pela primeira vez em cirurgia oral e maxilofacial humana (Choukroun et al., 2001). Tem sido muito utilizado em diversos ramos da Medicina Humana, principalmente em medicina dentária e estomatologia, onde existe maior investigação científica (Dohan et al., 2009; Miron et al., 2017). A sua utilização tem vindo a crescer na medicina geral humana para uma variedade de indicações, como no tratamento de úlceras diabéticas (Löndahl et al., 2015; O'Connell et al., 2008), na medicina e cirurgia ortopédica (Wang, Zhang, Choukroun, Ghanaati, & Miron, 2018), na regeneração de ligamentos e tendões (Dietrich et al., 2015) e em cirurgia plástica (Miron & Choukroun, 2017).

Recentemente, esta terapia começou a expandir-se para a Medicina Veterinária. Tem potenciais indicações clínicas como a melhoria da cicatrização de feridas cutâneas e a reparação de tecidos moles em cães e equinos, onde existem estudos que apresentam resultados positivos relativamente à utilização do PRF (Visser et al., 2011; Alishahi et al., 2013; Hamed et al., 2019). No entanto, os estudos que consideram o PRF em animais ainda são limitados em número.

#### 5.2.5. Uso de PRF na cicatrização de feridas

A aplicação do PRF em feridas cutâneas tem sido estudada devido às suas ótimas características, já previamente descritas (Yaprak, Kasap, Akpınar, Islek, & Sinanoglu, 2018). O PRF parece fornecer todos os importantes constituintes que contribuem para um melhor processo de cicatrização de feridas tais como, (i) as células sanguíneas – plaquetas, leucócitos e macrófagos; (ii) uma acumulação de fatores de crescimento estimulantes dos processos da cicatrização; e (iii) uma matriz de fibrina tridimensional, que permite uma maior contenção das células e uma mais lenta e maior libertação de fatores de crescimento, em comparação com o PRP (Dietrich et al., 2015).



Em geral, o sangue é um dos principais fornecedores de células e proteínas essenciais para a cicatrização de feridas. Uma vez que uma ferida ocorre, dá-se a primeira fase, a hemóstase, onde a cascata de coagulação é ativada nos primeiros minutos e umas das suas células-chave são as plaquetas que são importantes reguladoras da hemostasia pela formação de coágulos de fibrina, da inflamação e da regeneração pela libertação de fatores de crescimento que atraem leucócitos e fibroblastos para o local da lesão (Theoret, 2005). Outras células sanguíneas importantes são os neutrófilos e macrófagos, os quais são células inflamatórias, que têm como principal função a remoção de detritos, tecido necrótico e bactérias da ferida (Theoret, 2017). O efeito biológico do PRF contribui, assim, para o melhoramento do processo da angiogénese, do controlo imunológico e do processo de epitelização (Choukroun et al., 2006). Os produtos de degradação da fibrina e do fibrinogénio (FDP) modulam a migração de neutrófilos, a adesão destes ao endotélio e ao fibrinogénio, a sua fagocitose e o processo de degradação enzimática (Choukroun et al., 2006). A sua utilização parece ser promissora no caso de feridas infetadas. Para além, dos fatores de crescimento libertados pelas plaquetas, também existem fatores de crescimento sanguíneos inicialmente presos entre a rede de fibrina como FGF $\beta$ , VEGF e PDGF, influenciando consideravelmente a formação dos capilares por células endoteliais. Também, a sua estrutura rígida e propriedades mecânicas favorece este processo (Choukroun et al., 2006). Outra vantagem do PRF, sendo considerado um biomaterial de fibrina natural, é a sua capacidade de guiar a migração das células epiteliais à superfície de tecidos lesados, através do seu efeito no metabolismo das células epiteliais e dos fibroblastos (Choukroun et al., 2006). A fibrina, fibronectina, PDGF e TGF $\beta$  são essenciais para modular a expressão de integrinas, proliferação de fibroblastos e a sua migração no interior da ferida (Gray, Bishop, Reeves, & Laurent, 1993). Assim, contribui para a proteção de feridas abertas e aceleração da sua cicatrização (Choukroun et al., 2006). Também esta matriz serve como suporte para as células-estaminais circulantes, que contribuem para a restauração vascular e tecidual e para a regeneração de células ósseas de todo o tipo (Choukroun et al., 2006). Segundo Choukroun et al. (2006), a estrutura da rede de fibrina do PRF é o elemento chave de todos os processos de cicatrização.

Segundo Theoret (2017), o PRF autólogo e natural pode providenciar as condições ideais para que as células envolvidas na cicatrização de feridas de equinos possam migrar, proliferar e diferenciar-se. Em conclusão, as aplicações clínicas conhecidas do PRF mostram aceleração da cicatrização tecidual devido ao desenvolvimento da neovascularização, encerramento acelerado das feridas com rápida remodelação do tecido cicatricial e a ausência quase total de eventos infecciosos (Choukroun et al., 2006).

## V. MATERIAIS E MÉTODOS

### 1. Caracterização da população em estudo

A recolha de dados utilizados foi realizada entre os meses de setembro de 2018 e maio de 2019, na zona centro/sul do país, pela aluna, em equinos pacientes da Hcmae Lda e, também, referenciados por diferentes médicos veterinários de clínica ambulatória equina.

A população utilizada teve como base a casuística da clínica e foram selecionados todos os cavalos que se apresentavam em boas condições de saúde e boa condição física, mas com a presença de uma ferida cutânea accidental, aberta, com cicatrização por 2ª intenção e sempre localizadas nos membros distais. O total da população consistiu em nove cavalos, três do sexo feminino e seis do sexo masculino, todos de diferentes raças, mas maioritariamente da raça Lusitana, e utilizados para diferentes modalidades como o ensino ou apenas de lazer. A suas idades também foram variadas (média  $\pm$  DP;  $9,6 \pm 10,3$  e mediana=4).

No caso de feridas encontradas estagnadas numa fase da cicatrização à mais de um mês, foi realizada a confirmação da eventual presença de *Habronema muscae*, através da observação e identificação das larvas numa pequena amostra da lesão, realizadas no Laboratório de Parasitologia da Faculdade de Medicina Veterinária. A sua presença seria um critério de exclusão do estudo. Em nove cavalos, encontrou-se um nesta situação, em que o teste foi negativo quanto à presença de larvas de *H. muscae*., no entanto, como prevenção, administrou-se uma injeção de ivermectina IM (0,02 mg/kg).

Grande parte das feridas avaliadas foram simples, ou seja, envolveram só a pele e não afetaram outras estruturas do corpo, com exceção de um cavalo que apresentou o envolvimento do tendão extensor digital lateral, tendo este sido lacerado transversalmente com a lesão (cavalo pertencente ao grupo laser). A lesão (Figura 7) encontrava-se situada no tarso lateral e o corte do tendão envolvido não comprometeu nem a mobilidade nem a função do cavalo posterior à lesão, resultando num bom prognóstico.

Figura 7- Ferida com o envolvimento de tecidos moles na lesão.



## 2. Grupos de estudo

O presente estudo incidiu sobre três métodos terapêuticos diferentes de abordagem a uma ferida de cicatrização por segunda intenção em membros distais do cavalo, de modo a avaliar o efeito de cada um, em separado, na cicatrização de feridas. Cada tratamento foi distribuído por animal dependente da preferência e disponibilidade dos proprietários, concordância do Médico Veterinário em relação à melhor terapia para o caso e situação geográfica onde se encontrava o animal. Deste modo, constituíram-se três grupos de animais, que serão descritos subsequentemente.

Em todos eles, a avaliação e o início das terapias aplicadas tiveram início após o estabelecimento de uma boa superfície de tecido de granulação a preencher totalmente a ferida e terminou quando o tecido de granulação já não era visível, altura em que considerámos a ferida encerrada (Tsang et al., 2017).

Em todas as visitas, as feridas pertencentes aos três grupos, foram avaliadas macroscopicamente e de seguida limpas com uma solução de soro fisiológico 0,9% NaCl e compressas. Também em todas elas executou-se a tricotomia da zona adjacente à lesão, quando necessário.

Em todas as lesões foi realizado um penso que consistiu numa gaze parafinada (Jelonet, Smith & Nephew Medical Ltd, Hull, UK) e compressas como primeira camada, algodão e como segunda camada, seguida de uma ligadura de gaze e, como última, uma ligadura autoadesiva. Em alguns cavalos foi necessário o uso de sedação baixa (6 µg/kg Detomidina + 6 µg/kg Butorfanol) para os primeiros pensos.

No caso de o tecido de granulação estar elevado acima do nível da derme quando a ferida era observada pela primeira vez, foi necessário cortar com a ajuda de uma lâmina de barbear até ficar ao nível da pele, de modo a prevenir a produção de tecido de granulação exuberante e o atraso subjacente na cicatrização.

## 2.1. Grupo Controlo

Neste grupo todas as feridas (n=3) foram tratadas de forma semelhante, embora, por vezes, por Médicos Veterinários diferentes. Por solicitação do proprietário ou Médico Veterinário, foi impossível evitar a utilização de pomadas cicatrizantes, como, por exemplo, um gel de ácido hipocloroso (Vetericyn Animal Wellness, EUA) ou uma pomada de alginato de prata. Após a pomada tópica aplicada, era realizado o penso. Neste grupo, os pensos foram substituídos, em média, semanalmente até ao encerramento da ferida.

## 2.2. Grupo Laser

As feridas deste grupo (n=3), para além da limpeza e do penso terem sido realizados de semelhante forma ao descrito no grupo controlo, foram submetidas a sessões de laser. As sessões de laser tiveram início quando a ferida se apresentava completamente preenchida pelo tecido de granulação. Nos casos em que foi necessário cortar o tecido de granulação exuberante, a primeira sessão teve início um dia após o procedimento. As sessões de tratamento e a substituição do penso foram realizadas, em média, em dias alternados, até a ferida ser considerada encerrada.

Existem duas técnicas de aplicação da terapia do laser, (i) a técnica ponto-a-ponto, para lasers com menos de 1W de potência e áreas de tratamento de menor tamanho, e (ii) a técnica do movimento ou de *scanning*, que consiste na manutenção da peça do feixe de luz em movimento a 2–7 cm/s (Smith, 2017). Esta técnica é utilizada com lasers de maior potência porque evita a acumulação excessiva de calor nos tecidos (Smith, 2017) e foi a praticada em todos os cavalos do presente estudo, a 2 cm/s.

Uma das maiores preocupações com lasers de alta potência é o aquecimento excessivo dos tecidos (Riegel & Godbold, 2017). Esta situação é facilmente evitada com a técnica do movimento, se a seleção da área e da dose total for a adequada e se o técnico manter a velocidade e, se necessário, usar o seu dedo como um termómetro digital (Riegel & Godbold, 2017; Smith, 2017). Ao longo de toda a sessão, a sonda deve estar sempre perpendicular à superfície irradiada, para diminuir ao máximo a divergência da luz (Riegel & Godbold, 2017). O feixe de luz do laser deve ser movido sobre o tecido alvo, bem como uma margem de tecido normal adjacente, para permitir que a área afetada e as zonas envolventes que são, também, pontos de dor, sejam efetivamente tratadas (Pryor & Millis, 2015). No entanto, é necessário ter em atenção que o cálculo da dose total deve ser para a área total de tratamento e não só para a área da lesão

(Pryor & Millis, 2015). A área de tratamento do presente estudo consistiu na área da lesão com 3cm de diâmetro adicionais.

Inicialmente, para melhorar a penetração do laser (Pryor & Millis, 2015; Hochman, 2018), rapou-se o pêlo e realizou-se a limpeza da ferida com compressas. Posteriormente, deu-se início à aplicação do laser.

O laser terapêutico utilizado no presente estudo é um laser diodo de arseneto de gálio e alumínio (GaIAs), de classe 4 (LT10-2 Laser Therapy, Mano Médical, Taden, França), com os comprimentos de onda 810 nm e 980 nm, ambos utilizados em todas as sessões de laser do presente estudo. A seleção dos parâmetros do laser utilizados para cada cavalo teve como base o tipo de animal, a cor da pelagem e o tipo de lesão (Pryor & Millis, 2015). e os programas formulados para cada ferida foram baseados nas doses recomendadas para lesões tecidulares superficiais em cavalos, segundo Riegel e Godbold (2017), e na dimensão da área de tratamento.

Cada sessão consistiu em cinco ciclos de duração igual, dos quais os primeiro e último emitiram um feixe contínuo (CW) a uma potência de 2,4W; o segundo, terceiro e quarto emitiram um pulso repetido com frequências de 25, 300 e 5000 Hz, respectivamente, e a uma potência de 1,2W. Esta alteração de frequências ajuda a que todas células-alvo recebam a energia necessária à sua estimulação, pois diferentes tecidos que compõem as partes anatómicas alvo do organismo respondem diferentemente dependendo das frequências utilizadas. As áreas de tratamento foram diferentes em cada ferida e em cada sessão realizada, logo, após a medição de cada ferida, foram calculados os parâmetros com o objetivo de fornecer doses dentro do intervalo recomendado (1-5 J/cm<sup>2</sup>). As áreas de tratamento do presente estudo variaram entre 18 e 64 cm<sup>2</sup>. Assim, dependentes da dimensão da área de tratamento, a energia total fornecida variou entre 67,2 e 267,6 J e o tempo das sessões variou entre 40 e 161s. Consequentemente, a dose aplicada variou entre 2,9 e 6,1 J/cm<sup>2</sup> e a intensidade entre 0,03 e 0,09 W/cm<sup>2</sup>. O tamanho do ponto utilizado foi 15 mm.

### 2.3. Grupo Fibrina Rica em Plaquetas

**Preparação do PRF** (Figura 8): Para a realização do tratamento com a Fibrina Rica em Plaquetas (PRF), foi necessário preparar o concentrado autólogo imediatamente antes da aplicação do mesmo.

A metodologia aplicada baseou-se no protocolo segundo Choukroun (2001) e consistiu, em primeiro lugar, na recolha de uma amostra de sangue da veia jugular do cavalo com um porta-tubo VENOJET e uma agulha 20G 0.9X25 (Vacutainer PrecisionGlide BD, New Jersey, EUA),

para, no mínimo, dois ou mais tubos de 10 mL sem anticoagulante. Os tubos utilizados foram Tubos Secos Vermelhos, revestidos com ativador de coágulo, de 10 mL cada (Vacutainer BD, New Jersey, EUA). A quantidade de tubos utilizada foi dependente da quantidade necessária para aplicar na lesão, ou seja, no caso de lesões de maiores dimensões foi necessário um maior número de tubos para que o PRF formado preenchesse toda a superfície da ferida. Após a colheita de sangue, as amostras foram centrifugadas em conjunto e submetidas a 10000 rpm (aproximadamente 708g) durante 10 min. O coágulo de fibrina formado foi isolado com muito cuidado com uma pinça de prensão e sujeito a compressão durante 10 min para descartar o soro contido nele (Dohan et al., 2006b; Hamed et al., 2019), após a qual foi aplicado em toda a superfície da ferida, fixado pela gaze parafinada.

O tempo entre a recolha de sangue e o início da centrifugação é muito importante, tendo de ser o mínimo possível (<30seg), caso contrário, a formação do coágulo não será a adequada (Dohan et al., 2006a; Hamed et al., 2019).

Figura 8- Apresentação da preparação da Fibrina Rica em Plaquetas e material utilizado.



**Terapia do PRF:** As sessões de aplicação do PRF foram, também, realizadas em dias alternados até ao encerramento de cada ferida (n=3). Nos casos em que, também, foi necessário cortar o tecido de granulação exuberante, a primeira aplicação teve início um dia após o procedimento. Depois da aposição à ferida do PRF, o penso foi realizado como descrito no grupo controlo e substituído em cada sessão de tratamento.

### 3. Avaliação e medição das feridas

A avaliação e medição das nove lesões foi realizada a partir do primeiro dia do tecido de granulação completar toda a superfície da solução de continuidade e até ao desaparecimento deste, dia em que considerámos o encerramento da ferida.

Dos nove cavalos, seis foram tratados, avaliados e medidos em visitas de consulta pela aluna e três cavalos foram tratados e fotografados por outro Médico Veterinário, cujas fotografias da ferida foram enviadas à aluna, para a sua posterior medição.

Para a avaliação clínica das feridas, o tecido de granulação foi classificado semi-quantitativamente como (Wilmink et al., 1999): regularidade da superfície: 0 = regular, 1 = irregular (Figura 9); aspecto superficial: 0 = rosa e limpo, 1 = purulento ou necrótico (Figura 10).

Figura 9 - Classificação do tecido de granulação quanto à regularidade da superfície.



- (a) Nível 0 = Regular;
- (b) Nível 1 = Irregular.

Figura 10 - Classificação do tecido de granulação quanto ao seu aspeto superficial.



- (a) Nível 0 = Rosa e limpo;
- (b) Nível 1 = Purulento ou necrótico.



Para a medição da área da superfície das feridas utilizou-se uma fita métrica e mediu-se duas distâncias: a largura e a altura medidas na zona da ferida em que os seus bordos se encontravam mais afastados, perpendiculares entre elas (Figura 11). Esta forma manual de medição é considerada limitada visto ser sempre uma interpretação sujeita a erro humano.

Figura 11 – Exemplo das medições ao longo da recolha de dados do presente estudo



No caso das feridas avaliadas presencialmente, foi obtida uma fotografia digital e, posteriormente, foi medida a superfície da solução de continuidade, sempre de modo semelhante e nos mesmos pontos. No caso das restantes feridas, em que não foi possível a consulta presencial, o Médico Veterinário referente fotografou digitalmente a ferida com uma régua aposta à superfície da pele, com o objetivo de ser um marcador de referência nas fotografias. Assim foi possível à aluna fazer todas as medições, através de um software de imagem (Image J, National Institutes of Health, Maryland, EUA). Cada ferida foi medida e fotografada sempre que era realizada a alteração de penso e antes da aplicação da terapia correspondente (Figura 12).

Figura 12 - Fotografias digitais das medições das feridas com fita métrica ao longo da recolha de dados do presente estudo.

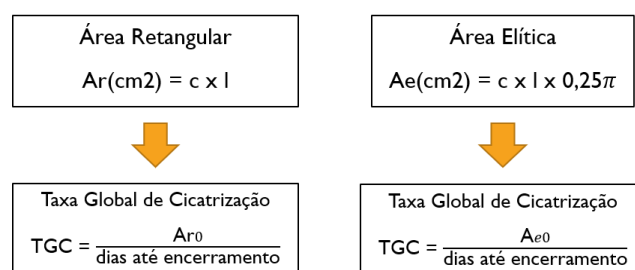




Depois de ter as duas medições, a área da superfície da ferida foi calculada e registrada, através de duas diferentes fórmulas: a área retangular que consiste na multiplicação do comprimento pela largura (comprimento(cm) x largura(cm)); e a área elítica que consiste no cálculo da forma elítica (comprimento(cm) x largura(cm)x0,25 $\pi$ ) (Bowling et al., 2009) (Figura 13).

Por fim foi determinada a taxa global de cicatrização das feridas (cm<sup>2</sup> / dia), que consistiu na divisão da área da ferida quando se apresentava completamente preenchida pelo tecido de granulação pelo total de dias até completar o seu encerramento (Bischofberger et al., 2013; Tsang et al., 2017) (Figura 13). Por outras palavras, esta taxa representa a média da redução diária de cada ferida.

Figura 13 – Fórmulas dos cálculos utilizados para as áreas retangular e elítica e para a taxa global de cicatrização.



Outros parâmetros importantes na cicatrização de uma ferida são a epitelização e a contração. Neste estudo não foi possível calcular as taxas de epitelização e de contração, no entanto, foi calculado o tempo, em dias, desde a realização da ferida até o início da epitelização.

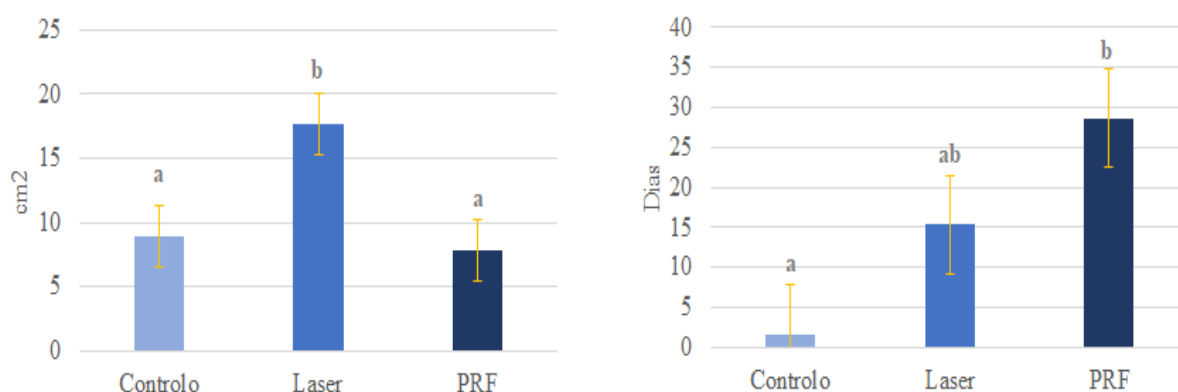
#### 4. Análise estatística

Os resultados quantitativos foram expressos com a média  $\pm$  erro padrão (SE). O programa TIBCO Statistica (TIBCO Software Inc, California, USA) foi utilizado para analisar estatisticamente tanto as características iniciais de cada ferida, tais como a área inicial da superfície entre os bordos das feridas e o tempo entre o traumatismo e a primeira observação médico-veterinária, como as características dependentes da terapêutica aplicada, que consistem no tempo entre a realização da ferida e o início do processo de epitelização e a taxa global de cicatrização das feridas entre os grupos controlo, laser e PRF. Foi realizada uma análise de variância a um fator (One-Way ANOVA) para comparação das médias dos grupos. Para determinar se as diferenças entre grupos foram significativas, o nível de significância considerado foi de  $P < 0,05$  utilizando um teste post-hoc de comparação de médias (teste de Duncan).

## VI. RESULTADOS

No total das nove feridas analisadas, 66,7% das lesões localizavam-se nos membros anteriores e 33,3% nos posteriores. Relativamente à sua localização no membro, 33,3% pertenciam à zona do carpo/ tarso, 22,2% à zona da canela, 11,1% no boleto, 11,1% na quartela e 22,2% no casco. Quando considerada a área inicial da superfície de cada ferida, antes do início dos tratamentos, verificou-se uma dimensão máxima de 25 cm<sup>2</sup>, mínima de 5,1 cm<sup>2</sup> e uma média global de 11,5 ± 5,5 cm<sup>2</sup> (média±DP). No entanto, quando as feridas foram distribuídas pelos diferentes grupos de tratamento, as do grupo laser foram as que apresentaram uma maior área média (retangular), em relação aos restantes grupos (P<0,05; Gráfico 2 e Tabela 4). Outra variante avaliada foi a distância de tempo entre a realização da ferida e a primeira intervenção médico-veterinária que foi, na globalidade, de 15,2 ± 14,1 dias (média±DP). Os cavalos do grupo PRF, em média, apresentaram-se mais tarde à consulta que os cavalos do grupo controlo (P<0,05), embora os do grupo laser se apresentassem num tempo semelhante aos do grupo controlo e do grupo PRF (Gráfico 3). Assim, a média da duração total de cada ferida (desde o momento do traumatismo até ao encerramento da ferida) foi muito variável em toda a amostra com uma média global de 58,3 ± 12,8 dias (média±DP), o que levou a não tendo sido considerada como uma variável de tratamento.

Gráficos 2 e 3 – O gráfico da esquerda corresponde às áreas iniciais das feridas (cm<sup>2</sup>) e o gráfico da direita, está representado o tempo decorrido desde a realização das feridas até à primeira observação médico-veterinária.



As colunas dos gráficos correspondem à média ± erro padrão. Letras diferentes referem-se a diferenças significativas entre grupos, para esse parâmetro em avaliação. Nível de significância de P<0,05.

Tabela 4 – Dimensão inicial de cada ferida.

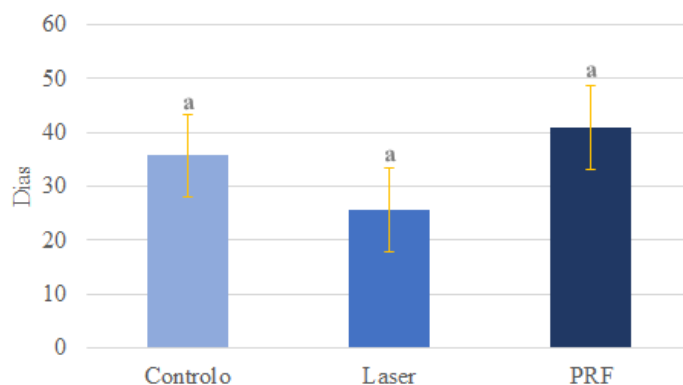
<i>Grupos</i>	<i>Dimensão Inicial (cm<sup>2</sup>)</i>
<i>Controlo</i>	9
<i>Controlo</i>	7,7
<i>Controlo</i>	9,9
<i>Laser</i>	15
<i>Laser</i>	12,9
<i>Laser</i>	25
<i>PRF</i>	7,5
<i>PRF</i>	5,1
<i>PRF</i>	11

Relativamente à avaliação clínica, foi observado, tanto a nível de regularidade do tecido de granulação como de aspeto, em ambos os grupos de tratamento com laser ou com PRF, uma melhoria significativa ao longo do tempo de tratamento. Todas as feridas pertencentes a estes dois grupos, que se encontravam na classificação 1 em qualquer um dos parâmetros, acabaram por alterar para a classificação 0, sem ter piorado posteriormente. Já no grupo controlo existiram feridas que mantiveram a classificação 1 até ao seu encerramento e uma das feridas que se encontrava numa classificação 0, voltou a classificação 1 relativa ao seu aspeto (Figura 12).

Dos quatro cavalos que foram acompanhados desde o início da lesão, três eram do grupo controlo ( $8 \pm 2,4$  dias) e um do grupo laser (22 dias).

Com base no Gráfico 4, é possível observar que as feridas do grupo do laser iniciaram o processo de epitelização, em média, mais cedo que as do grupo controlo e que as feridas do grupo do PRF mais tarde que o grupo controlo. No entanto não foi observada nenhuma diferença significativa entre os três grupos.

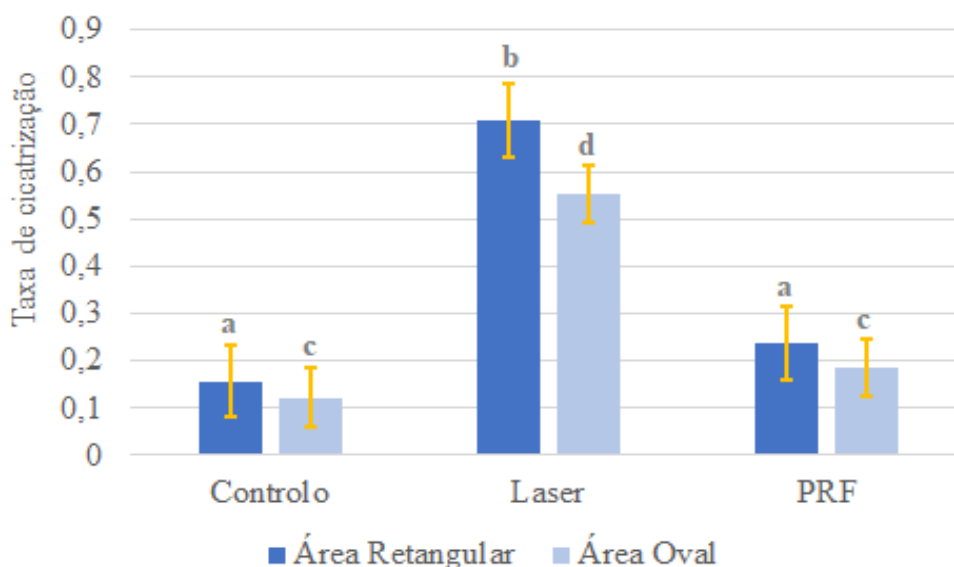
Gráfico 4 – Início do processo de epitelização nos diferentes grupos de estudo.



As colunas do gráfico correspondem à média  $\pm$  erro padrão. Letras diferentes referem-se a diferenças significativas entre grupos, para esse parâmetro em avaliação. Nível de significância de  $P < 0,05$ .

Assim, como parâmetro de comparação entre os três grupos foi utilizada a taxa global de cicatrização das feridas ( $\text{cm}^2 / \text{dia}$ ). Esta redução foi calculada através das áreas retangulares ou através das áreas elíticas, ambas representadas no Gráfico 5 e na Tabela 5.

Gráfico 5 - Taxas globais de cicatrização nos diferentes grupos de estudo.



No gráfico estão representadas as taxas globais de cicatrização de cada grupo de tratamento (controlo, laser, PRF), considerando as áreas retangulares (azul escuro) ou as áreas elíticas (azul claro). As colunas do gráfico correspondem à média  $\pm$  erro padrão. Letras diferentes referem-se a diferenças significativas entre grupos, para esse parâmetro em avaliação. Nível de significância de  $P < 0,05$ .

Tabela 5 – Taxa global de cicatrização de cada ferida.

Grupos	Taxa Global de Cicatrização ( $\text{cm}^2/\text{dia}$ )	
	Retangular	Elítica
Controlo	0,12	0,09
Controlo	0,17	0,14
Controlo	0,23	0,19
Laser	0,84	0,66
Laser	0,54	0,42
Laser	1,02	0,8
PRF	0,35	0,27
PRF	0,24	0,19
PRF	0,29	0,23

Neste estudo, foram observadas diferenças significativas entre as taxas de cicatrização das feridas do grupo controlo e as feridas tratadas com laser ( $P < 0,05$ ). No entanto entre o grupo controlo e o grupo do PRF não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ). O tratamento com laser mostrou ser mais efetivo quando comparado com o PRF ( $P < 0,05$ ). Os resultados revelaram-se semelhantes tanto para a área retangular como para a elítica.

Figura 14 – Exemplos da evolução das feridas de cada grupo, ao longo do tempo.

**Grupo Controlo (1.6x4.8 cm)**



Dia 1

Dia 5

Dia 43

**Grupo Laser (5x5 cm)**



Dia 1

Dia 7

Dia 27

**Grupo PRF (3x2,5 cm)**



Dia 1

Dia 7

Dia 21

## VII. DISCUSSÃO

O presente trabalho analisa a eficácia de duas abordagens terapêuticas (a aplicação de laser ou de PRF) na cicatrização de feridas nos membros distais de equino, em relação ao tratamento clássico (pomada cicatrizante + penso).

A cicatrização é um processo complexo e dinâmico, e a sua evolução está sujeita a diversos tipos de fatores relativos ao indivíduo, tais como a espécie animal (Wilmink, 2017), a idade (Wicke et al., 2009), o seu estado nutricional e a sua perfusão sanguínea (Dart, Sole- Guitart, Stashak, & Theoret, 2017). A natureza da própria ferida bem como a sua localização, as estruturas envolventes, o nível de contaminação e a existência de processos patológicos são determinantes no processo de cicatrização de feridas por segunda intenção (Hendrickson & Virgin, 2005; Dart et al., 2017).

O tipo e localização da ferida são bons indicadores do nível de contaminação, de perfusão sanguínea e de viabilidade do tecido envolvente, principalmente em feridas acidentais (Hendrickson & Virgin, 2005; Dart et al., 2017). Por esta razão e por serem o tipo de feridas mais comum em equinos (Owen et al., 2012), todas as feridas que foram objeto de estudo neste trabalho encontravam-se localizadas apenas nos membros distais.

Apesar de uma ferida aberta de equino tolerar bem elevadas concentrações de bactérias, a sua infeção, ou seja, a multiplicação das bactérias e uma exuberante inflamação nos tecidos adjacentes atrasará o processo de cicatrização (Dart et al., 2017). Assim, optámos por manter o penso para proteção da ferida até ao seu encerramento, com o objetivo de diminuir a variabilidade das condições de cicatrização entre feridas, pois todos os cavalos se encontravam em locais distintos sob condições ambientais muito diferentes.

As feridas também podem ser invadidas por parasitas como é o caso das miíases, as chamadas “feridas de verão”, muito comuns em Portugal. Uma miíase é causada por larvas de *Habronemmus muscae*, que são depositadas pelas moscas na superfície da ferida e que se alimentam desta, criando uma reação granulomatosa, que impede a evolução do processo de cicatrização, mantendo-se numa situação estacionária semelhante àquela antes do início do tratamento (Dart et al. 2017). Por esta razão, foram necessários os testes de exclusão desta patologia em feridas que não evoluíam há mais de um mês, previamente ao estudo.

No presente estudo, também, foi essencial a manutenção dos cavalos observados fora de trabalho porque o movimento compromete a integridade dos capilares, os depósitos de colagénio e o epitélio neoformados (Knottenbelt, 2003), o que contribui para a perpetuação da inflamação e para a produção de tecido de granulação exuberante, situação muito comum em cavalos (Dart et al., 2017).

Para um conhecimento mais preciso, o ideal seria fazer um estudo comparativo de feridas com dimensões iguais, realizadas no mesmo dia, situadas nos mesmos locais nos mesmos cavalos. Neste caso, tal não foi possível devido à recolha de dados ter ocorrido no âmbito da clínica ambulatória e em animais privados, estando dependente da casuística, da disponibilidade dos proprietários dos animais e do Médico Veterinário e, ainda, do tempo a que este foi chamado pela primeira vez para avaliação da ferida. Assim, realizou-se este estudo com condições diferentes entre cada cavalo, mas, também mais perto da realidade da clínica ambulatória de equinos. Apesar do estudo não estar sob condições controladas, ainda assim foi possível tirar algumas conclusões sobre a rapidez da cicatrização nos diferentes grupos avaliados.

Foram calculadas duas áreas diferentes - retangular e elítica - para todas as medições, porque ambas se encontram descritas na bibliografia (Bowling et al., 2009; Tsang et al., 2017) e considerou-se interessante entender se cada uma influenciou de maneira diferente os resultados. Tal não aconteceu: a comparação entre grupos manteve-se igual, embora a taxa global de cicatrização de cada grupo da área elítica fosse sempre mais baixa que a taxa global de cicatrização da área retangular. Segundo (Madison & Gronwall, 1992), nos cavalos o formato da ferida não influencia a contração da mesma.

Relativamente à dimensão inicial, existem estudos em humanos que afirmam que o tamanho e a profundidade afetam a cicatrização (Kirsner & Eaglstein, 1993). No entanto, não existem estudos em cavalos que corroborem esta informação. Neste estudo, para além da dimensão inicial ser diferente entre cavalos, também o tempo de espera entre a realização da ferida e a primeira observação veterinária diferiu, o que poderá ter influenciado a duração total de encerramento da ferida. Em estudos onde existe a indução de feridas cirúrgicas num grupo homogêneo de cavalos, localizado no mesmo local e sob as mesmas condições, avalia-se como variável de tratamento o tempo total de encerramento de cada ferida e a duração de cada fase pois todas as feridas têm a mesma dimensão inicial. Devido às dimensões iniciais e aos tempos de recolha de dados díspares para todos os cavalos, não foi possível comparar estes parâmetros. Assim foi calculada para a comparação entre os grupos o tempo até o início do processo de epitelização e a taxa global de cicatrização para cada cavalo.

A avaliação clínica apenas permitiu concluir que, tanto no grupo laser como no grupo PRF, todas as feridas que apresentavam uma elevada irregularidade ou um aspeto purulento ou necrótico do tecido de granulação, aparentaram uma eventual melhoria para a formação de um tecido rosa e regular e a manutenção nestas características até ao seu encerramento. Tal não se verificou em todas as feridas do grupo controlo. Não foi possível comparar, entre os grupos, o tempo que cada cavalo demorou a preencher completamente a ferida de tecido de granulação porque cinco cavalos, pertencentes ao grupo do laser e ao grupo do PRF, só começaram a ser

avaliados a partir dos 16 dias, no mínimo, após a lesão, o que significou que quando foram observados pela primeira vez já tinham formado totalmente o seu tecido de granulação sem que fosse possível saber o primeiro dia da sua completa formação. Um dos restantes cavalos, em que foi possível a avaliação deste parâmetro e que pertencia ao grupo do laser, completou o preenchimento do tecido de granulação, de facto, só após 22 dias, um valor mais elevado comparado com as feridas do grupo controlo ( $8 \pm 2,4$  dias). No entanto, este foi o cavalo com o tendão extensor digital lateral envolvido na lesão, podendo ser a justificação para o seu atraso. Segundo Hendrickson e Virgin, (2005), se a ferida afetar outras estruturas, para além da pele, a sua cicatrização poderá sofrer complicações.

Outro parâmetro que seria interessante avaliar seria a influência que a contração e a epitelização têm no encerramento da lesão (Wilmink et al., 1999). No entanto, tal não foi exequível no presente estudo. Foi apenas calculado o tempo, em dias, desde a realização da ferida até o início do processo de epitelização, que não diferiu entre os três grupos. Pelo contrário, existem estudos que mostram uma mais rápida epitelização nas feridas tratadas, através da estimulação do crescimento, proliferação e diferenciação das células epiteliais, tanto com a aplicação de laser (Gál et al., 2006; Iordanou et al., 2008; Meirelles et al., 2008), como de PRF (Hamed et al., 2019).

Há evidências na literatura de que a irradiação com laser tem um efeito terapêutico na cicatrização de feridas, existindo no entanto estudos que referem que em feridas de cavalos tratamento não mostrou qualquer melhoria (Fretz & Li, 1992). Assim, ao longo de todos estes anos de investigação, continua a ser um tema controverso. Esta situação deve-se à escassez de estudos bem desenhados, com uma amostra homogênea e suficientemente grande para ser representativa da população e com a escolha dos parâmetros do laser adequados à situação clínica da amostra. (Chung et al., 2012). No entanto, existem evidências suficientes para justificar o seu uso instruído na prática clínica, não deixando de ser necessário mais investigação para entender as suas condições ideais em Medicina Veterinária. Os resultados do nosso estudo apoiam a observação de que a irradiação com laser administrada nas doses descritas afeta positivamente a cicatrização de feridas nos membros distais de equino, através do aumento da sua taxa de cicatrização.

Nos últimos anos, a fibrina rica em plaquetas (PRF), que é um dos produtos derivados do sangue tal como o PRP, tem sido usada para acelerar a regeneração de tecidos (Joseph Choukroun et al., 2006). Foi demonstrado uma superioridade clínica em relação ao PRP devido ao facto de combinar os benefícios de uma libertação gradual e prolongada dos fatores de crescimento, bem como a formação de um coágulo de fibrina que cria uma base estrutural para os processos celulares (De Pascale et al., 2015; Dietrich et al., 2015; Fujioka-Kobayashi & Miron, 2017).



Existem estudos, em Medicina Humana, que mostraram o papel positivo do PRF aplicado localmente para promover a cicatrização de feridas (Pinto et al., 2018) e em medicina oral (Miron et al., 2017). No presente estudo, utilizou-se PRF autólogo que tem diversas vantagens como a facilidade de preparação, a utilização de um produto natural, o baixo custo e a capacidade de se conseguir obter grande quantidade de sangue a qualquer momento. A preparação do PRF provou ser fácil, exigir pouca destreza técnica e ser de baixo custo para os proprietários, conforme descrito (Dohan et al., 2006a). Nos seus resultados, o uso de PRF não apresentou nenhuma diferença significativa em relação ao grupo controle ao longo do tempo até o início do processo de epitelização e na melhoria da taxa global de cicatrização das feridas do membro distal de equinos. Estes resultados não são concordantes com um recente estudo científico de aplicação de PRF em feridas dos membros distais de burros (Hamed et al., 2019) ou com outro estudo aplicado em cães (Alishahi, 2014). No entanto, a maioria das taxas de cicatrização das feridas do grupo do PRF foram superiores às taxas do grupo controle, com exceção de uma.

É importante relembrar as limitações deste estudo, tais como o pequeno número da amostra, a utilização de produtos tópicos variados nas feridas do grupo controle e a falta de mais parâmetros de avaliação do processo de cicatrização das feridas, como por exemplo, a duração total da cicatrização das feridas, a influência dos processos de contração e de epitelização na cicatrização e a avaliação histológica após cicatrização.

Este estudo clínico preliminar, teve as suas limitações devido ao reduzido apoio bibliográfico relativamente à aplicação das terapias de laser e de PRF em equinos. Por essa razão houve a necessidade de adaptar e elaborar protocolos terapêuticos baseados na experiência pessoal e na bibliografia existente sobre a aplicação de cada terapia em Medicina Veterinária e Humana. Esta adaptação incluiu a decisão da dose do laser e a sua variação, os valores de centrifugação do sangue para obtenção do PRF, a durabilidade do protocolo terapêutico e a frequência das administrações.

## VIII. CONCLUSÃO

Embora seja necessário interpretar os resultados com algum cuidado, devido ao pequeno número da amostra, podemos afirmar que a terapia laser aplicada com os parâmetros definidos no presente trabalho acelera o processo de cicatrização de feridas cutâneas dos membros distais de equino, pois a sua taxa global de cicatrização foi significativamente superior aos grupos controlo e, também, PRF. Apesar das suas limitações, o presente estudo conseguiu obter resultados muito positivos no que diz respeito às feridas tratadas com laser, o que sugere a importância deste como objeto de maior investigação e aprofundamento científico. Relativamente ao PRF, a sua taxa global de cicatrização não mostrou diferenças significativas com o grupo controlo. No entanto, estudos futuros controlados, em feridas do membro distal de equino, com uma maior amostragem, poderiam obter melhores resultados na utilização do PRF como adjuvante da aceleração da cicatrização. Seria, pois, uma mais valia para a prática clínica devido ao facto de ser uma metodologia de utilização de um produto autólogo, de baixo valor económico e de fácil preparação.

## IX. BIBLIOGRAFIA

- Albertini, R., Villaverde, A., Aimbire, F., Bjordal, J., Brugnera, A., Mittmann, J., Costa, M. (2008). Cytokine mRNA expression is decreased in the subplantar muscle of rat paw subjected to carrageenan-induced inflammation after low-level laser therapy. *Photomedicine and Laser Surgery*, 26, 19–24.
- Alishahi, M., Kazemi, D., Mohajeri, D., Mofidpoor, H., & Goli, A. (2013). Histopathological evaluation of the effect of platelet-rich fibrin on canine cutaneous incisional wound healing. *Iranian Journal of Veterinary Science and Technology*, 5, 19–32.
- Anders, J., Ketzi, A., & Xingjia, W. (2017). Basic principles of photobiomodulation and its effects at the cellular, tissue, and system levels. Em R. Riegel, & J. Goodbold Jr., *Laser Therapy in Veterinary Medicine* (pp. 36-51). West Sussex, UK; Ames, USA: John Wiley and Sons, Inc.
- Anders, J., Lanzafame, R. J., & Arany, P. R. (2015). Low-level light/laser therapy versus photobiomodulation therapy. *Photomedicine and Laser Surgery*, 33, 183–184.
- Anders, J., Moges, H., Wu, X., Erbele, I., Alberico, S., Saidu, E., Smith, J., Pryor, B. (2014). In vitro and in vivo optimization of infrared laser treatment for injured peripheral nerves. *Lasers in Surgery and Medicine*, 46, 34–45.
- American National Standards Institute (ANSI) (2011). American National Standard for Safe Use of Lasers in Health Care Facilities. ANSI Z136 Committee. Washington, DC, USA.
- Bayat, M., Azari, A., & Golmohammadi, M. (2009). Effects of 780-nm low-level laser therapy with a pulsed gallium aluminum arsenide laser on the healing of a surgically induced open skin wound of rat. *Photomedicine and Laser Surgery*, 28(4), 465–470.
- Bertone, A. (1989). Principles of wound healing. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 5, 449–463.
- Bischofberger, A., Dart, C., Perkins, N., Kelly, A., Jeffcott, L., & Dart, A. (2013). The effect of short- and long-term treatment with manuka honey on second intention healing of contaminated and noncontaminated wounds on the distal aspect of the forelimbs in horses. *Veterinary Surgery*, 42, 154–160.
- Bjordal, J., Johnson, M., Iversen, V., Aimbire, F., & Lopes-Martins, R. (2006). Low-level laser therapy in acute pain: a systematic review of possible mechanisms of action and clinical effects in randomized placebo-controlled trials. *Photomedicine and Laser Surgery*, 24, 158–168.
- Bogdan, C. (2001). Nitric oxide and the immune response. *Nature Immunology*, 2, 907–916.
- Bowling, F., King, L., Fadavi, H., Paterson, J., Preece, K., Daniel, R., Matthews, D., Boulton, A. (2009). An assessment of the accuracy and usability of a novel optical wound measurement system. *Diabetic Medicine*, 26, 93-96.
- Bradley, D. (2017). Wounds. Em R. Riegel, & J. Godbold Jr., *Laser Therapy in Veterinary Medicine* (pp. 100-113). West Sussex, UK; Ames, USA: John Wiley and Sons, Inc.

- Budras, K.-D., Sack, W., Röck, S., Horowitz, A., & Berg, R. (2011). Skin. Em K.-D. Budras, W. Sack, S. Röck, A. Horowitz, & R. Berg, *Anatomy of the Horse* (pp. 2-3). Hannover, Germany: Schlütersche Verlagsgesellschaft mbH & Co. KG.
- Byrnes, K., Barna, L., Chenault, V., Waynant, R., Ilev, I., Longo, L., Miracco, C., Johnson, B., Anders, J. (2004). Photobiomodulation improves cutaneous wound healing in an animal model of type II diabetes. *Photomedicine and Laser Surgery*, 22, 281–290.
- Choukroun, J., Adda, F., Schoeffler, C., & Vervelle, A. (2001). Une opportunité en parodontologie: le PRF. *Implantodontie*, 42, 55-62.
- Choukroun, J., & Ghanaati, S. (2018). Reduction of relative centrifugation force within injectable platelet-rich-fibrin (PRF) concentrates advances patients' own inflammatory cells, platelets and growth factors: the first introduction to the low speed centrifugation concept. *European Journal of Trauma and Emergency Surgery*, 44, 87–95.
- Choukroun, J., Diss, A., Simonpieri, A., Girard, M., Schoeffler, C., Dohan, S., Dohan, A., Mouhyi, J., Dohan, D. (2006). Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part IV: Clinical effects on tissue healing. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*, 101, 56–60.
- Choukroun, J., & Ghanaati, S. (2017). Introducing the low-speed centrifugation concept. Em R. Miron & J. Choukroun, *Platelet Rich Fibrin in Regenerative Dentistry: Biological Background and Clinical Indications* (pp. 33-46). West Sussex, UK; Ames, USA: John Wiley & Sons, Ltd.
- Choukroun, J., & Miron, R. (2017). Platelet rich fibrin: a second-generation platelet concentrate. Em R. Miron & J. Choukroun, *Platelet Rich Fibrin in Regenerative Dentistry: Biological Background and Clinical Indications* (pp. 1–14). West Sussex, UK; Ames, USA: John Wiley & Sons, Ltd.
- Chung, H., Dai, T., Sharma, S., Huang, Y., Carroll, J., & Hamblin, M. (2012). The nuts and bolts of low-level laser (light) therapy. *Annals of Biomedical Engineering*, 40, 516–533.
- Coldren LA, C. (2012). *Diode Lasers and Photonic Integrated Circuits*. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.
- Cuddy, L. (2017). Wound closure, tension-relieving techniques, and local flaps. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, 47, 1221–1235.
- Dahlgren, L. (2018). Regenerative medicine therapies for equine wound management. *Veterinary Clinics of North America - Equine Practice*, 34, 605–620.
- Dart, A. J., Sole- Guitart, A., Stashak, T. S., & Theoret, C. (2017). Selected Factors that Negatively Impact Healing. Em C. Theoret, & J. Schumacher, *Equine Wound Management, 3rd Edition* (pp. 30-46). Ames, USA: John Wiley & Sons, Inc
- De Pascale, M., Sommese, L., Casamassimi, A., & Napoli, C. (2015). Platelet derivatives in regenerative medicine: an update. *Transfusion Medicine Reviews*, 29, 52–61.

- Desmoulière, A. (1995). Factors influencing myofibroblast differentiation during wound healing and fibrosis. *Cell Biology International*, 19, 471-476.
- Dietrich, F., Duré, G., Klein, C., Bampi, V., Padoin, A., Silva, V., & Braga-Silva, J. (2015). Platelet-rich fibrin promotes an accelerated healing of achilles tendon when compared to platelet-rich plasma in rat. *World Journal of Plastic Surgery*, 4, 101-109.
- Dohan, D., Choukroun, J., Diss, A., Dohan, S., Dohan, A., Mouhyi, J., & Gogly, B. (2006a). Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part I: Technological concepts and evolution. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*, 101, 37-44.
- Dohan, D., Choukroun, J., Diss, A., Dohan, S., Dohan, A., Mouhyi, J., & Gogly, B. (2006b). Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part II: Platelet-related biologic features. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*, 101, 45-50.
- Dohan D., Diss, A., Odin, G., Doglioli, P., Hippolyte, M., & Charrier, J. (2009). In vitro effects of Choukroun's PRF (platelet-rich fibrin) on human gingival fibroblasts, dermal prekeratinocytes, preadipocytes, and maxillofacial osteoblasts in primary cultures. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*, 108, 341-352.
- Draper, W., Schubert, T., Clemmons, R., & Miles, S. (2012). Low-level laser therapy reduces time to ambulation in dogs after hemilaminectomy: A preliminary study. *Journal of Small Animal Practice*, 53, 465-469.
- Duesterdieck-Zellmer, K., Larson, M., Plant, T., Sundholm-Teppe, A., & Payton, M. (2016). Ex vivo penetration of low-level laser light through equine skin and flexor tendons. *American Journal of Veterinary Research*, 77, 991-999.
- Dyson, M. (1997). Advances in wound healing physiology: The comparative perspective. *Veterinary Dermatology*, 8, 227-233.
- El Bagdadi, K., Kubesch, A., Yu, X., Al-Maawi, S., Orlowska, A., Dias, A., Ghanaati, S. (2016). Reduction of relative centrifugal forces increases growth factor release within solid platelet-rich-fibrin (PRF)-based matrices: a proof of concept of LSCC (low speed centrifugation concept). *European Journal of Trauma and Emergency Surgery*, 45, 467-479.
- Elce, Y. (2017). Approaches to Wound Closure. Em & J. Schumacher, C. Theoret, *Equine Wound Management, 3rd Edition* (pp. 157-171). Ames, USA: John Wiley & Sons, Inc.
- Frank, L., & Roynard, P. (2018). Veterinary neurologic rehabilitation: The rationale for a comprehensive approach. *Topics in Companion Animal Medicine*, 33, 49-57.
- Fretz, P., & Li, Z. (1992). Low energy laser irradiation treatment for second intention wound healing in horses. *The Canadian Veterinary Journal. La Revue Vétérinaire Canadienne*, 33, 650-653.

- Fujioka-Kobayashi, M., & Miron, R. (2017). Biological Components of Platelet Rich Fibrin: Growth Factor Release and Cellular Activity. *Platelet Rich Fibrin in Regenerative Dentistry: Biological Background and Clinical Indications*, 15–31.
- Fujioka-Kobayashi, M., Miron, R., Hernandez, M., Kandalam, U., Zhang, Y., & Choukroun, J. (2017). Optimized platelet-rich fibrin with the low-speed concept: growth factor release, biocompatibility, and cellular response. *Journal of Periodontology*, 88, 112–121.
- Gagnon, D., Gibson, T., Singh, A., zur Linden, A., Kazienko, J., & LaMarre, J. (2016). An in vitro method to test the safety and efficacy of low-level laser therapy (LLLT) in the healing of a canine skin model. *BMC Veterinary Research*, 12, 1–10.
- Gál, P., Vidinský, B., Toporcer, T., Mokrý, M., Mozeš, Št., Longauer, F., & Sabo, J. (2006). Histological assessment of the effect of laser irradiation on skin wound healing in rats. *Photomedicine and Laser Surgery*, 24, 480–488.
- Ghanaati, S., Booms, P., Orlowska, A., Kubesch, A., Lorenz, J., Rutkowski, J., Choukroun, J. (2014). Advanced Platelet-Rich Fibrin: A New Concept for Cell-Based Tissue Engineering by Means of Inflammatory Cells. *Journal of Oral Implantology*, 40, 679–689.
- Gray, A., Bishop, J., Reeves, J., & Laurent, G. (1993).  $\alpha\alpha$  and  $B\beta$  chains of fibrinogen stimulate proliferation of human fibroblasts. *Journal of Cell Science*, 104, 409–413.
- Hackett, R. (1983). Delayed wound closure, A review and report of use of the technique on three equine limb wounds. *Veterinary Surgery*, 12, 48–53.
- Hamblin, M., & Demidova, T. (2006). Mechanisms of low level light therapy. In *Proceedings of International Society for Optics and Photonics (SPIE): 10 de Fevereiro de 2010, California, United States (Vol. 6140, 614001)*.
- Hamed, M., Abouelnasr, K., El-Adl, M., Abo Elfadl, E., Farag, A., & Lashen, S. (2019). Effectiveness of allogeneic platelet-rich fibrin on second-intention wound healing of experimental skin defect in distal limb in donkeys (*Equus asinus*). *Journal of Equine Veterinary Science*, 73, 131–138.
- Hendrickson, D., & Virgin, J. (2005). Factors that affect equine wound repair. *Veterinary Clinics of North America - Equine Practice*, 21, 33–44.
- Hendrickson, D. (2019). Management of Superficial Wounds, Deep and Chronic Wounds, Sinus Tracts, and Fistulas. In *J. A. Auer, J. A. Stick, J. M. Kümmerle, & T. Prange, Equine Surgery, 5th Edition (pp. 403-404)*. Missouri, USA: Elsevier.
- Hewitt, P. (2001). *Conceptual Physics 9th edition*. Boston, USA: Addison Wesley.
- Hilborn, R. (1982). Einstein coefficients, cross sections, f values, dipole moments, and all that. *American Journal of Physics*, 50, 982–986.
- Hochman, L. (2018). Photobiomodulation therapy in veterinary medicine: A review. *Topics in Companion Animal Medicine*, 33, 83–88.

- Hosgood, G. (2006). Stages of wound healing and their clinical relevance. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, 36(4), 667–685.
- Hosgood, G. (2009). The biology of wound healing. Em J. Williams, & A. Moores, *BSAVA Manual of Canine and Feline Wound Management and Reconstruction* (pp. 1-14). United Kingdom: British Small Animal Veterinary Association.
- Hsieh, Y., Chou, L., Chang, P., Yang, C., Kao, M., & Hong, C. (2012). Low-level laser therapy alleviates neuropathic pain and promotes function recovery in rats with chronic constriction injury: Possible involvements in hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ). *Journal of Comparative Neurology*, 520, 2903–2916.
- Huang, C., Akaishi, S., & Ogawa, R. (2012). Mechanosignaling pathways in cutaneous scarring. *Archives of Dermatological Research*, 304, 589–597.
- International Electrotechnical Commission (IEC) (2014). Safety of laser products - Part 1: Equipment classification and requirements. IEC 60825-1:2014. Geneva, Switzerland.
- Iordanou, P., Lykoudis, E., Athanasiou, A., Koniaris, E., Papaevangelou, M., Fatsea, T., & Bellou, P. (2008). Effect of visible and infrared polarized light on the healing process of full-thickness skin wounds: An experimental study. *Photomedicine and Laser Surgery*, 27, 261–267.
- Jacobs, K., Leach, D., Fretz, P., & Townsend, H. (1984). Comparative Aspects of the Healing of Excisional Wounds on the Leg and Body of Horses. *Veterinary Surgery*, 13, 83–90.
- Jenkins, P., & Carroll, J. (2011). How to report low-level laser therapy (LLLT)/Photomedicine dose and beam parameters in clinical and laboratory studies. *Photomedicine and Laser Surgery*, 29, 785–787.
- Johnston, D. (1990). Wound healing in skin. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, 20, 1–25.
- Johnson, J., Buijs, S., Godbold, J., Bradley, D., Miller, L., Arza, R., & Godine, R. (2017). Clinical Applications of Laser Therapy in Companion Animals. Em R. Riegel, & J. Godbold Jr., *Laser Therapy in Veterinary Medicine* (pp. 75-211). John Wiley and Sons, Inc.: West Sussex, UK; Ames, USA.
- Kaneps, A. (2016). Practical Rehabilitation and Physical Therapy for the General Equine Practitioner. *Veterinary Clinics of North America - Equine Practice*, 32, 167–180.
- Kani, T. (1994). Mechanisms of interaction of monochromatic visible light with cells. In *Proceedings of International Society for Optics and Photonics (SPIE): Effects of Low-Power Light on Biological Systems*, 2630, 2–9, Moscovo, Russia.
- Karu, T. (1999). Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 49, 1–17.
- Kirsner, R., & Eaglstein, W. (1993). The Wound Healing Process. *Dermatologic Clinics*, 11, 629–640.

- Knottenbelt, D. (1997). Equine wound management: Are there significant differences in healing at different sites on the body? *Veterinary Dermatology*, 8, 273–290.
- Knottenbelt, D. (2003). 4 Factors that Delay Healing. Em D. Knottenbelt, *Handbook of Equine Wound Management* (pp. 25-31). Liverpool, UK: Saunders.
- Kuffler, D. (2015). Photobiomodulation in promoting wound healing: a review. *Regenerative Medicine*, 1746–0751.
- Larjava, H., Salo, T., Haapasalmi, K., Kramer, R., & Heino, J. (1993). Expression of integrins and basement membrane components by wound keratinocytes. *Journal of Clinical Investigation*, 92, 1425–1435.
- Liekens, S., De Clercq, E., & Neyts, J. (2001). Angiogenesis: Regulators and clinical applications. *Biochemical Pharmacology*, 61, 253–270.
- Löndahl, M., Tarnow, L., Karlsmark, T., Lundquist, R., Nielsen, A., Michelsen, M., Jörgensen, B. (2015). Use of an autologous leucocyte and platelet-rich fibrin patch on hard-to-heal DFUs: a pilot study. *Journal of Wound Care*, 24, 172–178.
- Madison, J., & Gronwall, R. (1992). Influence of wound shape on wound contraction in horses. *American Journal of Veterinary Research*, 53, 1575–8.
- Marie Gross, D. (2014). Introduction to therapeutic lasers in a rehabilitation setting. *Topics in Companion Animal Medicine*, 29, 49–53.
- Meirelles, G., Santos, J., Chagas, P., Moura, A., & Pinheiro, A. (2008). A comparative study of the effects of laser photobiomodulation on the healing of third-degree burns: A histological study in rats. *Photomedicine and Laser Surgery*, 26, 159–166.
- Mellor, D., Love, S., Walker, R., Gettinby, G., & Reid, S. (2001). Sentinel practice-based survey of the management and health of horses in northern Britain. *Veterinary Record*, 149, 417–423.
- Miron, R., & Choukroun, J. (2017). Use of Platelet Rich Fibrin in Other Areas of Medicine. *Platelet Rich Fibrin in Regenerative Dentistry: Biological Background and Clinical Indications* (pp 237–249). West Sussex, UK; Ames, USA: John Wiley & Sons, Ltd
- Miron, R., Zucchelli, G., Pikos, M., Salama, M., Lee, S., Guillemette, V., Choukroun, J. (2017). Use of platelet-rich fibrin in regenerative dentistry: a systematic review. *Clinical Oral Investigations*, 21, 1913–1927.
- Noudeh, Y., Shabani, M., Vatankhah, N., Hashemian, S., & Akbari, K. (2010). A combination of 670 nm and 810 nm diode lasers for wound healing acceleration in diabetic rats. *Photomedicine and Laser Surgery*, 28, 621–627.
- Nurden, A. (2011). Platelets, inflammation and tissue regeneration. *Thrombosis and Haemostasis*, 105, 13–33.
- O’Connell, S., Impeduglia, T., Hessler, K., Wang, X., Carroll, R., & Dardik, H. (2008). Autologous platelet-rich fibrin matrix as cell therapy in the healing of chronic lower-extremity ulcers. *Wound Repair and Regeneration*, 16, 749–756.



- Oliveira, P. C., Pinheiro, A. L. B., Reis Junior, J. A., de Castro, I. C. V., Gurgel, C., Noia, M. P., Ramalho, L. M. P. (2010). Polarized Light ( $\lambda$ 400–2000 nm) on Third-Degree Burns in Diabetic Rats: Immunohistochemical Study. *Photomedicine and Laser Surgery*, 28(5), 613–619.
- Owen, K. R., Singer, E. R., Clegg, P. D., Ireland, J. L., & Pinchbeck, G. L. (2012). Identification of risk factors for traumatic injury in the general horse population of north-west England, Midlands and north Wales. *Equine Veterinary Journal*, 44(2), 143–148.
- Passarella, S., & Karu, T. (2014). Absorption of monochromatic and narrow band radiation in the visible and near IR by both mitochondrial and non-mitochondrial photoacceptors results in photobiomodulation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 140, 344–358.
- Peplow, P. V., Chung, T., & Baxter, G. D. (2010). Laser Photobiomodulation of Wound Healing: *Photomedicine and Laser Surgery*, 28(3), 291–325.
- Pessoa, E. S., Melhado, R. M., Theodoro, L. H., & Garcia, V. G. (2004). A Histologic Assessment of the Influence of Low-Intensity Laser Therapy on Wound Healing in Steroid-Treated Animals. *Photomedicine and Laser Surgery*, 22(3), 199–204.
- Pinto, N. R., Ubilla, M., Zamora, Y., Del Rio, V., Dohan Ehrenfest, D. M., & Quirynen, M. (2018). Leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF) as a regenerative medicine strategy for the treatment of refractory leg ulcers: a prospective cohort study. *Platelets*, 29(5), 468–475.
- Pope, J. (2009). Wound etiology and classification. Em J. Williams, & A. Moores, *BSAVA Manual of Canine and Feline Wound Management and Reconstruction* (pp. 15-24). United Kingdom: British Small Animal Veterinary Association.
- Porter, M. (1992). Therapeutic Lasers. *Journal of Equine Veterinary Science*, 12, 49–56.
- Prindeze, N., Moffatt, L., & Shupp, J. (2012). Mechanisms of action for light therapy: A review of molecular interactions. *Experimental Biology and Medicine*, 237, 1241–1248.
- Proksch, E., Brandner, J., & Jensen, J. (2008). The skin: an indispensable barrier. *Experimental Dermatology*, pp. 1063–1072.
- Provost, P. (2019). Wound Healing. Em J. Auer, (2019). *Equine Surgery, Fifth Edition*. (pp. 53-69). Missouri, USA: Elsevier.
- Pryor, B., & Millis, D. (2015). Therapeutic Laser in Veterinary Medicine. *Veterinary Clinics of NA: Small Animal Practice*, 45, 45–56.
- Richard, G. (2017). Neurological Conditions. Em R. Riegel, & J. Godbold, Jr., *Laser Therapy in Veterinary Medicine* (pp. 179-187). West Sussex, UK; Ames, USA: John Wiley and Sons, Inc.
- Riegel, R. (2017). The History of Laser Therapy. Em R. Riegel, & J. Godbold, Jr., *Laser Therapy in Veterinary Medicine* (pp. 3-6). West Sussex, UK; Ames, USA: John Wiley and Sons, Inc.

- Riegel, R., & Godbold, J. (2017). Fundamental Information. Em R. Riegel, & J. Godbold, *Laser Therapy in Veterinary Medicine* (pp. 9-18). West Sussex, UK; Ames, USA: John Wiley and Sons, Inc.
- Robson, M. (1979). Infection in the surgical patient: an imbalance in the normal equilibrium. *Clinics in Plastic Surgery*.
- Rodrigo, S., Cunha, A., Pozza, D., & Blaya, D. (2009). Analysis of the systemic effect of red. *Photomedicine And Laser Surgery*, 27, 929–935.
- Schlachter, C., & Lewis, C. (2016). Electrophysical therapies for the equine athlete. *Veterinary Clinics of North America - Equine Practice*, 32, 127–147.
- Schumacher, J., & Stashak, T. (2017). Management of Wounds of the Distal Extremities. Em & J. Theoret, *Equine Wound Management, 3rd Edition*. Ames, USA: John Wiley & Sons, Inc.
- Scott, D. W., & Miller, J. W. (2011). Structure and Function of the Skin. Em D. W. Scott, & W. H. Miller, Jr., *Equine Dermatology* (pp. 1-34). Missouri, USA: Elsevier Saunders.
- Serini, G., Ropraz, P., Geinoz, A., Borsi, L., Zardi, L., & Gabbiani, G. (1998). The fibronectin domain ED-A is Crucial for myofibroblastic phenotype induction by transforming growth factor-  $\beta$ 1, 142, 873–881.
- Silver, I. (1982). Basic physiology of wound healing in the horse. *Equine Veterinary Journal*, 14, 7–15.
- Singer, A., & Clark, R. (1999). Cutaneous Wound Healing. *The New England Journal of Medicine*, 341, 738-46
- Smith, J. (2017). General Principles of Laser Therapy. Em & J. Riegel, *Laser Therapy in Veterinary Medicine* (pp. 55-66). West Sussex, UK; Ames, USA: John Wiley and Sons, Inc.
- Stashak, T., & Theoret, C. (2014). Integumentary System: Wound Healing, Management, and Reconstruction. Em J. Orsini, & T. Divers, *Equine Emergencies: Treatment and Procedures 4th Edition* (pp. 238-267). Missouri, USA: Elsevier Saunders.
- Theoret, C. (2005). The pathophysiology of wound repair. *Veterinary Clinics of North America - Equine Practice*, 21, 1–13.
- Theoret, C. (2009). Tissue engineering in wound repair: The three “r”s - Repair, replace, regenerate. *Veterinary Surgery*, 38, 905–913.
- Theoret, C. (2017). Innovative Adjunctive Approaches to Wound Management. Em C. Theoret, & J. Schumacher, *Equine Wound Management, 3rd Edition* (pp. 508-529). Ames, USA: John Wiley & Sons, Inc.
- Theoret, C. (2017). Physiology of Wound Healing. Em C. Theoret, & J. Schumacher, *Equine Wound Management, 3rd Edition* (pp. 1-13). Ames, USA: John Wiley & Sons, Inc.

- Thomas, D., O'Neill, I., Harding, K., & Shepherd, J. (1995). Cutaneous wound healing. A current perspective. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 53, 442–447.
- Tsang, A., Dart, A., Sole-Guitart, A., Dart, C., Perkins, N., & Jeffcott, L. (2017). Comparison of the effects of topical application of UMF20 and UMF5 manuka honey with a generic multifloral honey on wound healing variables in an uncontaminated surgical equine distal limb wound model. *Australian Veterinary Journal*, 95, 333–337.
- Vasilenko, T., Slezák, M., Kováč, I., Bottková, Z., Jakubčo, J., Kostelníková, M., Tomori, Z., Gál, P. (2009). The effect of equal daily dose achieved by different power densities of low-level laser therapy at 635 and 670 nm on wound tensile strength in rats: A short report. *Photomedicine and Laser Surgery*, 28, 281–283.
- Visser, L., Arnoczky, S., Caballero, O., & Gardner, K. (2011). Evaluation of the use of an autologous platelet-rich fibrin membrane to enhance tendon healing in dogs. *American Journal of Veterinary Research*, 72, 699–705.
- Waldron, D., & Zimmermen-Pope, N. (2003). Superficial Skin Wounds. Em D. Slatter, *Textbook of Small Animal Surgery, 3th Edition* (pp. 258-273). Philadelphia, USA: Elsevier Science.
- Wang, X., Zhang, Y., Choukroun, J., Ghanaati, S., & Miron, R. J. (2018). Effects of an injectable platelet-rich fibrin on osteoblast behavior and bone tissue formation in comparison to platelet-rich plasma. *Platelets*, 29, 48–55.
- Weiss N, Oron U. (1992). Enhancement of muscle regeneration in the rat gastrocnemius muscle by low energy laser irradiation. *Anatomy and Embryology*, 186, 497–503.
- Wicke, C., Bachinger, A., Coerper, S., Beckert, S., Witte, M., & Königsrainer, A. (2009). Aging influences wound healing in patients with chronic lower extremity wounds treated in a specialized wound care center. *Wound Repair and Regeneration*, 17, 25–33.
- Wilmink, J., Herten, J., Weeren, P., & Barneveld, A. (2002). Retrospective study of primary intention healing and sequestrum formation in horses compared to ponies under clinical circumstances. *Equine Veterinary Journal*, 34, 270–273.
- Wilmink, J., Nederbragt, H., Weeren, P., Stolk, P., & Barneveld, A. (2001). Differences in wound contraction between horses and ponies: the in vitro contraction capacity of fibroblasts. *Equine Veterinary Journal*, 33, 499–505.
- Wilmink, J., Van Weeren, P., Stolk, P., Van Mil, P., & Barneveld, A. (1999). Differences in second-intention wound healing between horses and ponies: macroscopic aspects. *Equine Veterinary Journal*, 31, 53–60.
- Wilmink, J., & Van Weeren, P. (2005). Second-intention repair in the horse and pony and management of exuberant granulation tissue. *Veterinary Clinics of North America - Equine Practice*, 21, 15–32.
- Wilmink, J. (2017). Differences in Wound Healing between Horses and Ponies. Em & J. C. Theoret, *Equine Wound Management, 3rd Edition* (pp. 14-29). Ames, USA: John Wiley & Sons, Inc.

- Xue, M., & Jackson, C. (2015). Extracellular matrix reorganization during wound healing and its impact on abnormal scarring. *Advances in Wound Care*, 4, 119–136.
- Yaprak, E., Kasap, M., Akpınar, G., Islek, E. E., & Sinanoğlu, A. (2018). Abundant proteins in platelet-rich fibrin and their potential contribution to wound healing: An explorative proteomics study and review of the literature. *Journal of Dental Sciences*, 13, 386–395.

## X. ANEXOS

Anexo I – Tipo de encerramento de feridas e a sua cicatrização. Adaptado de Provost (2019).

<b>Encerramento primário</b>	Limpa	Encerramento imediato sem tensão.
<b>Encerramento primário adiado</b>	Limpas-contaminadas ou contaminadas; viabilidade dos tecidos questionável; edema; tensão.	Encerramento 2-3 dias após início da cicatrização; Lavagem e desbridamento da ferida ainda aberta.
<b>Encerramento secundário</b>	Contaminada ou suja	Encerramento 5 dias após início da cicatrização; Antes de encerrar, cortar tecido de granulação e bordos da ferida epitelizados.
<b>Encerramento por segunda intenção</b>	Ferida inapropriada para encerramento cirúrgico; grande defeito de pele e grande extensão de tecido desvitalizado.	Cicatrização por granulação, contração e epiteliação.

Anexo II – Classes dos lasers (IEC, 2014).

### Classes

<i>Classe 1</i>	São de muito baixo risco e o seu uso é seguro sob as circunstâncias normais.
<i>Classe 1M</i>	$\lambda = 302,5\text{nm} - 4000\text{nm}$ Têm potências mais altas, mas ainda de baixas intensidades, pois o seu feixe é divergente ou colimado de largo diâmetro. São seguros, exceto no uso de instrumentos óticos para olhar para os feixes.
<i>Classe 2</i>	$\lambda = 400\text{nm} - 700\text{nm}$ com potências até 1mW Sendo na gama da luz visível, estas fontes são inofensivas para os olhos devido à nossa ação reflexa de fechar os olhos quando atingidos pelo feixe.
<i>Classe 2M</i>	$\lambda = 400\text{nm} - 700\text{nm}$ com potências mais altas, mas feixes mais divergentes. Tornam-se inseguros quando são usados com instrumentos óticos.
<i>Classe 3R</i>	$\lambda = 302,5\text{ nm} - 10^6\text{ nm}$ com potências até 5mW São um risco quando focados ou observados durante um grande período de tempo.
<i>Classe 3B</i>	$\lambda = 302,5\text{ nm} - 10^6\text{ nm}$ com potências entre 5 e 500mW São normalmente perigosos sob condições de visualização direta do feixe, mas são seguros ao visualizar reflexões difusas
<i>Classe 4</i>	Potências maiores que 500mW São perigosos na observação direta do feixe e pelas radiações difusas. Deve ser usado óculos de proteção. Também, podem causar lesões na pele.

Anexo III - Parâmetros Fundamentais do Laser (Riegel & Godbold, 2017; Hochman, 2018).

<i>Parâmetros</i>	<i>Descrição</i>	<i>Unidades de Medida</i>
<i>Energia</i>	Grandeza física que pode ser transmitida entre objetos e convertida em diferentes formas, mas não pode ser criada ou destruída.	Joule (J)
<i>Dose/Densidade energética/exposição radiante</i>	Quantidade de energia transmitida pela área da superfície.	J/cm <sup>2</sup>
<i>Potência</i>	Taxa de emissão da energia, ou seja, é a expressão da energia ao longo do tempo.	Watt (W) (=J/seg)
<i>Densidade da potência/Intensidade/Radiância</i>	Densidade da radiação, ou seja, a potência incidente em uma determinada superfície.	W/cm <sup>2</sup>
<i>Comprimento de onda (<math>\lambda</math>)</i>	A distância entre dois pontos sucessivos, caracterizados pela mesma fase de oscilação, numa onda eletromagnética. O comprimento de onda de um laser determina a sua profundidade de absorção.	Nanómetro (nm)
<i>Frequência de Pulso</i>	O número de ondas de luz que passam num intervalo de tempo específico. Relativamente ao feixe do laser, considera-se a taxa de repetição do pulso.	Hertz (Hz)
<i>Tamanho do Ponto</i>	O diâmetro do feixe de laser na superfície do tecido a ser tratado livre.	Centímetros (cm)
<i>Ciclo de Trabalho</i>	Para um laser pulsado, a relação entre a duração total das emissões e o tempo total do tratamento, expresso em percentagem.	Percentagem (%)



## TERAPIAS REGENERATIVAS NO MANEIO DE FERIDAS DO MEMBRO DISTAL DO CAVALO: LASER OU FIBRINA RICA EM PLAQUETAS

M. Resende<sup>1</sup>, G. Ferreira-Dias<sup>1</sup>, C. Moreira da Fonseca<sup>2</sup>

<sup>1</sup>CIISA, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal;

<sup>2</sup>Horse Care Medicina Equina, Lisboa, Portugal

### Objetivos

Avaliação da eficácia do laser ou da fibrina rica em plaquetas (PRF) em feridas do membro distal de equino que cicatrizaram por segunda intenção, no que diz respeito à redução do tempo de cicatrização, quando comparadas com o método convencional do manejo de feridas (pomada tópica + penso).

### Introdução

As lesões traumáticas têm grande incidência na clínica equina, tanto em cavalos de competição como em cavalos de lazer.

A Medicina Regenerativa pode ser uma ferramenta muito importante no tratamento e na aceleração do processo de cicatrização de feridas dos membros distais de equinos.



A terapia com lasers de baixa potência tem como objetivo modular a resposta inflamatória e imunológica e promover a cicatrização de diferentes tipos de tecido.

O PRF é considerado uma 2ª geração dos concentrados plaquetários, com características inovadoras e um método de preparação mais simples.



### Materiais e Métodos

Controlo (n=3)	Laser (n=3)	PRF (n=3)
<b>Semanalmente</b>	<b>Dias alternados</b>	<b>Dias alternados</b>
• Limpeza	• Limpeza	• Limpeza
• Avaliação, Medição e Fotografia	• Avaliação, Medição e Fotografia	• Avaliação, Medição e Fotografia
• Pomada Tópica	• Terapia Laser	• Terapia com PRF
• Penso	• Penso	• Penso

#### Protocolo Laser

A seleção dos parâmetros do laser utilizados para cada cavalo teve como base o tipo de animal, a cor da pelagem, o tipo de lesão, a dimensão da lesão e a dose recomendada (Riegel e Godbold, 2017).



#### Protocolo PRF

A metodologia aplicada consistiu na utilização de PRF obtido de sangue autólogo centrifugado e aplicado topicamente nas feridas Choukroun, 2001).



### Medições e Taxa de Cicatrização



Área Retangular  
 $A_r(\text{cm}^2) = c \times l$

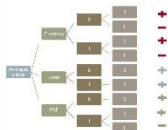
Taxa Global de Cicatrização  
 $TGC = \frac{\text{Área}}{\text{diâmetro do cicatrizamento}}$

Área Elíptica  
 $A_e(\text{cm}^2) = c \times l \times 0,25\pi$

Taxa Global de Cicatrização  
 $TGC = \frac{\text{Área}}{\text{diâmetro do cicatrizamento}}$

## Resultados

### Avaliação Clínica



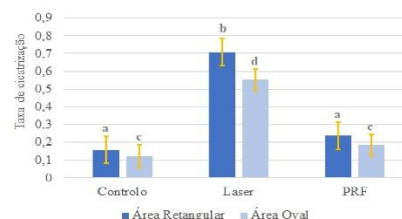
Para a avaliação clínica das feridas, o tecido de granulação foi classificado semi-quantitativamente: regularidade da superfície: 0 - regular, 1 - irregular; aspecto superficial: 0 - rosa e limpo, 1 - purulento ou necrótico.

#### Início do processo de epiteliação



No gráfico estão representados os dias entre a realização da ferida e o início do seu processo de cicatrização nos diferentes grupos de tratamento (controlo, laser e PRF). As colunas do gráfico correspondem à média ± erro padrão. Letras diferentes referem-se a diferenças significativas entre grupos, para esse parâmetro em avaliação. Nível de significância de  $P < 0,05$ .

### Taxas globais de cicatrização



No gráfico estão representadas as taxas globais de cicatrização de cada grupo de tratamento (controlo, laser, PRF), considerando as áreas retangulares (azul escuro) ou as áreas elípticas (azul claro). As colunas do gráfico correspondem à média ± erro padrão. Letras diferentes referem-se a diferenças significativas entre grupos, para esse parâmetro em avaliação. Nível de significância de  $P < 0,05$ .

### Conclusões

- A terapia laser aplicada (com os parâmetros definidos no presente trabalho) acelera o processo de cicatrização de feridas cutâneas dos membros distais de equino;
- O PRF não mostrou qualquer diferença significativa com o grupo controlo relativamente ao início da epiteliação e à taxa global de cicatrização;
- Este trabalho preliminar sugere a continuação de trabalhos de estudo em feridas do membro distal do cavalo utilizando laser e PRF numa maior amostragem e em condições controladas.

## **TERAPIAS REGENERATIVAS NO MANEIO DE FERIDAS DO MEMBRO DISTAL DO CAVALO: LASER OU FIBRINA RICA EM PLAQUETAS**

M. Resende<sup>1</sup>, G. Ferreira-Dias<sup>1</sup>, C. Moreira da Fonseca<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*CIISA, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal;*

<sup>2</sup>*Horse Care Medicina Equina, Lisboa, Portugal*

No cavalo, as feridas de membro distal que cicatrizam por segunda intenção, são potencialmente de resolução lenta. O objetivo deste estudo consistiu na avaliação do efeito da aplicação de duas terapias distintas, nomeadamente o laser ou a aplicação de Fibrina Rica em Plaquetas (PRF), em comparação com o método mais convencional na prática clínica. No total, foram incluídos 9 equinos (n=6 machos; n=3 fêmeas), com base no seu estado hígido normal e na presença de uma ferida aberta nos membros distais de etiologia traumática. Devido à casuística, todas as feridas variaram nas dimensões iniciais e nos tempos decorridos entre a lesão e a primeira observação clínica. Foram considerados o grupo controlo (pomada tópica+penso), o grupo laser (laser+penso) e o grupo PRF (PRF+penso). As feridas foram fotografadas e medidas periodicamente e foram determinadas a área retangular e área elíptica das mesmas. Foi calculada, para cada cavalo, a taxa de cicatrização, ou seja, a média de redução diária da área de cada ferida. Para a análise dos resultados utilizou-se o teste de variância unifactorial (one-Way ANOVA) e para a comparação entre os grupos utilizou-se o teste estatístico post-hoc de comparação de médias (Teste de Duncan), com significância considerada quando  $P < 0,05$ . Relativamente ao tempo decorrido até ao início do processo de epitelização, não foi observada qualquer diferença entre os três grupos. Relativamente à taxa de cicatrização, verificou-se um aumento no grupo laser em relação aos grupos controlo e PRF ( $P < 0,05$ ). Já entre o grupo PRF e o grupo controlo, não se verificou qualquer diferença significativa. Em conclusão, este estudo preliminar sugere a continuação de trabalhos de estudo em feridas do membro distal do cavalo recorrendo à utilização de laser, mas também, de PRF numa maior amostragem e em condições controladas.